

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2801.

ZSIGRAI SÁRA

Gasztroenterológia
című program

Programvezető: Dr. Molnár Béla, kutatóprofesszor

Témavezető: Dr. Molnár Béla, kutatóprofesszor

A folsav- és az S-adenozil-metionin-kezelés molekuláris biológiai hatásainak vizsgálata vastagbélrák sejtvonalakban

Doktori értekezés

dr. Zsigrai Sára

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Butz Henriett, Ph.D., egyetemi kutató
Dr. Iliás Ákos, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Dr. Dezső Katalin, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2022

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. BEVEZETÉS.....	10
2.1. DNS-metiláció	10
2.1.1. Az epigenetika alapjai	10
2.1.2. A DNS-metiláció szerepe.....	11
2.1.3. A DNS-metiláció folyamata.....	13
2.1.4. A táplálkozás hatása a DNS-metilációra, valamint a tumorképződésre.....	15
2.1.5. Az öregedés hatása a DNS-metilációra, valamint a tumorképződésre.....	16
2.2. Genomiális instabilitás.....	17
2.2.1. DNS-hibajavító útvonalak.....	17
2.2.2. A genomiális instabilitás formái	19
2.2.3. A genomiális instabilitás vizsgálómódszerei	20
2.3. A vastagbélrák	21
2.3.1. A vastagbélrák klinikai vonatkozásai.....	21
2.3.2. A vastagbélrák molekuláris háttere	23
2.3.3. A vastagbélrák molekuláris patológiai osztályozása.....	26
2.4. A folsav és az S-adenozil-metionin (SAM).....	27
2.4.1. A metildonor molekulák szerepe.....	27
2.4.2. A folátok.....	30
2.4.2.1. A folátok szerkezete és metabolizmusa	30
2.4.2.2. A folátok hiánya és pótlása	31
2.4.2.3. A folátok kapcsolata a karcinogenezissel	32
2.4.3. A SAM	34
2.4.3.1. A SAM szerkezete és metabolizmusa.....	34
2.4.3.2. A SAM hiánya és pótlása	35
2.4.3.3. A SAM kapcsolata a karcinogenezissel.....	35
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	37
4. MÓDSZEREK.....	38
4.1. Sejtenyésztes és -kezelés	38
4.1.1. A sejtek fenntartása	38

4.1.2. A sejtek kezelése	38
4.1.2.1. A sejtek kezelése folsavval	38
4.1.2.2. A sejtek kezelése SAM-mal.....	39
4.2. A sejtvonalak sejtbiológiai alapfolyamataira vonatkozó molekuláris vizsgálatok folsav- és SAM-kezelést követően	39
4.2.1. A sejtek életképességének és proliferációjának vizsgálata alamarBlue és szulforodamin B módszerekkel	39
4.2.2. A sejtciklus vizsgálata áramlási citometriával	40
4.2.3. Genomiális instabilitás vizsgálata mikronukleusz-számolással	40
4.2.4. Genomiális instabilitás vizsgálata comet próbával	41
4.2.5. Statisztikai számítások	41
4.3. A sejtvonalak epigenomikai, genomikai és transzkriptomikai változásaira vonatkozó genomszintű vizsgálatok folsav- és SAM-kezelést követően	42
4.3.1. Globális DNS-metiláció meghatározása LINE-1 piroszekvenálással.....	42
4.3.2. Genomszintű DNS-metiláció meghatározása Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) módszerrel.....	42
4.3.3. Genomszintű DNS-metiláció meghatározása bead array módszerrel	44
4.3.4. Genomszintű génexpressziós változások vizsgálata mikroarray módszerrel	45
4.3.5. A sejtvonalak mutációs profiljának vizsgálata teljesexom-szekvenálással...	46
5. EREDMÉNYEK.....	48
5.1. A folsav- és SAM-kezelés hatása a sejtproliferációra, sejtvitalitásra és sejtciklusra	48
5.1.1. Sejtproliferációs változások	48
5.1.1.1. Sejtproliferációs változások folsavkezelés hatására	48
5.1.1.2. Sejtproliferációs változások SAM-kezelés hatására	48
5.1.2. Sejtvitalitás-változások.....	49
5.1.2.1. Sejtvitalitás-változások folsavkezelés hatására	49
5.1.2.2. Sejtvitalitás-változások SAM-kezelés hatására	49
5.1.3. Sejtciklus-változások.....	50
5.1.3.1. Sejtciklus-változások folsavkezelés hatására	50
5.1.3.2. Sejtciklus-változások SAM-kezelés hatására	50
5.2. A folsav- és SAM-kezelés hatása a genom stabilitására.....	51
5.2.1. Mikronukleuszok számának változása	51

5.2.1.1. Mikronukleuszok számának változása folsavkezelés hatására.....	51
5.2.1.2. Mikronukleuszok számának változása SAM-kezelés hatására.....	52
5.2.2. A cometek hosszának változása	53
5.2.2.1. A cometek hosszának változása folsavkezelés hatására	53
5.2.2.2. A cometek hosszának változása SAM-kezelés hatására.....	54
5.3. A folsav- és SAM-kezelés hatása a DNS-metilációra	55
5.3.1. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása	55
5.3.1.1. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása folsavkezelés hatására	55
5.3.1.2. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása SAM-kezelés hatására	55
5.3.2. Genomszintű DNS-metilációs változások.....	56
5.3.2.1. Genomszintű DNS-metilációs változások folsavkezelés hatására	56
5.3.2.2. Genomszintű DNS-metilációs változások SAM-kezelés hatására	58
5.4. A folsav- és SAM-kezelés hatása a génexpresszióra.....	60
5.4.1. Génexpressziós változások folsavkezelés hatására	60
5.4.2. Génexpressziós változások SAM-kezelés hatására.....	63
5.5. A promótermetilációs és génexpressziós változásokra vonatkozó eredményeink összevetése.....	67
5.5.1. A promótermetilációs státusz és a génexpresszió együttes változása folsavkezelés hatására	67
5.5.2. A promótermetilációs státusz és a génexpresszió együttes változása SAM- kezelés hatására	67
5.6. A sejtvonalak mutációs profiljának felállítása az onkogének és az 1C metabolizmus génjeinek vonatkozásában	68
6. MEGBESZÉLÉS	71
6.1. A folsav- és SAM-kezelés hatása a sejtproliferációra, sejtiabilitásra és sejtciklusra	72
6.2. A folsav- és SAM-kezelés hatása a genom stabilitására.....	73
6.3. A folsav- és SAM-kezelés hatása a DNS-metilációra	74
6.4. A folsav- és SAM-kezelés hatása a génexpresszióra.....	75
6.5. Promótermetilációs és génexpressziós változásokra vonatkozó eredményeink ..	78
6.6. A sejtvonalak mutációs profilja az onkogének és az 1C metabolizmus génjeinek vonatkozásában	79

6.7. Legfontosabb új megállapítások	79
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	81
8. ÖSSZEFOGLALÁS	83
9. SUMMARY	84
10. IRODALOMJEGYZÉK	85
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	107
11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények	107
11.2. Egyéb –nem az értekezés témájában megjelent– közlemények	107
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	110

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1C	egy szénatomos (one-carbon)
5,10-metenil-THF	5,10-metenil-tetrahidrofolát
5,10-metilén-THF	5,10-metilén-tetrahidrofolát
5-formil-THF	5-formil-tetrahidrofolát
5-FU	5-fluorouracil
5mC	5-metil-citozin
5-metil-THF	5-metil-tetrahidrofolát
10-formil-THF	10-formil-tetrahidrofolát
AID/APOBEC	aktiváció által indukált citidin-deamináz/ apolipoprotein B mRNS szerkesztő enzim, katalitikus polipeptid (activation-induced cytidine deaminase/ apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide)
AJCC	Amerikai Rákellenes Tanács (American Joint Committee on Cancer)
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
ATCC	Amerikai Sejtkultúra Gyűjtemény (American Type Culture Collection)
A-típusú	öregedéshez társult (age-related)
ATM	ataxia teleangiectázia mutált
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
ATR	ataxia teleangiectázia és Rad3 rokon
BER	báziskivágó javítás (base excision repair)
Cdc25A	sejtosztódás ciklus 25A (cell division cycle 25A)
Cdc25C	sejtosztódás ciklus 25C

	(cell division cycle 25C)
CDK1	ciklinfüggő-kináz 1 (cyclin-dependent kinase 1)
CHK1	ellenőrzőpont-kináz 1 (checkpoint kinase 1)
CHK2	ellenőrzőpont-kináz 2 (checkpoint kinase 2)
CIMP	CpG-sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype)
CIMP-H	magas szintű CpG-sziget metilátor fenotípus (high level CpG island methylator phenotype)
CIMP-L	alacsony szintű CpG-sziget metilátor fenotípus (low level CpG island methylator phenotype)
CIN	kromoszomális instabilitás (chromosomal instability)
CMS	konszenzus molekuláris alcsoport (consensus molecular subtype)
CpG	citozin-foszfát-guanin dinukleotid (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide)
CRC	vastagbélrák (colorectal cancer)
C-típusú	karcinogenezishez társult (cancer-related)
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol (4,6-diamidino-2-phenylindole)
DDR	DNS-károsodási válasz (DNA damage response)
DHF	dihidrofolát
DHFR	dihidrofolát-reduktáz
DMG	dimetilglicin
DMS	megváltozott metilációs értéket adó hely (differentially methylated site)

DNMT	DNS-metil-transzferáz
dTMP	dezoxi-timidin-monofoszfát (deoxythymidine monophosphate)
dUMP	dezoxi-uridin-monofoszfát (deoxyuridine monophosphate)
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz
FACS	fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás (fluorescence-activated cell sorting)
FAP	familiáris adenomatózus polipózis
FC	expressziós intenzitáskülönbség (fold change)
FDA	Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszer- engedélyeztetési Hivatala (The United States Food and Drug Administration)
FdUMP	fluorodezoxi-uridin-monofoszfát (fluorodeoxyuridine monophosphate)
GEO	Génexpressziós Adatbázis (Gene Expression Omnibus)
GLOBOCAN	Globális Rákobszervatórium (Global Cancer Observatory)
HNPPC	herediter nonpolipózis kolorektális karcinóma (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
HR	homológ rekombináció
HTA	Humán Transzkriptom Array (Human Transcriptome Array)
KEGG	Kiotói Gén és Genom Enciklopédia (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
DAVID	Adatbázis Annotáláshoz, Ábrázoláshoz és Integrált Kutatáshoz (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)
LINE-1	hosszú közbeiktatott sejtmagi egység-1 (long interspersed nuclear element-1)

MAT	metionin-adenozil-transzferáz
metil-R	metildonor molekula
MMR	össze nem illő nukleotidpárok javítása (mismatch repair)
MS	metionin-szintáz
MSI	mikroszatellita-instabilitás
MSI-H	magas szintű mikroszatellita-instabilitás (high microsatellita instability)
MSI-L	alacsony szintű mikroszatellita-instabilitás (low microsatellita instability)
MSS	mikroszatellita-stabil
MTHFR	5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz
MTX	metotrexát
NER	nukleotidkivágó javítás (nucleotide excision repair)
NHEJ	nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end-joining)
PANTHER	Fehérjeelemzés Evolúciós Kapcsolatokon Keresztül (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships)
PBS	foszfát-pufferes sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCR	polimeráz-láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGF	vérlemezké-eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
pM	távoli metasztázis (distant metastasis)
pN	regionális nyirokcsomó (regional lymph node)
pT	primer tumor (primary tumor)
qPCR	kvantitatív polimeráz-láncreakció

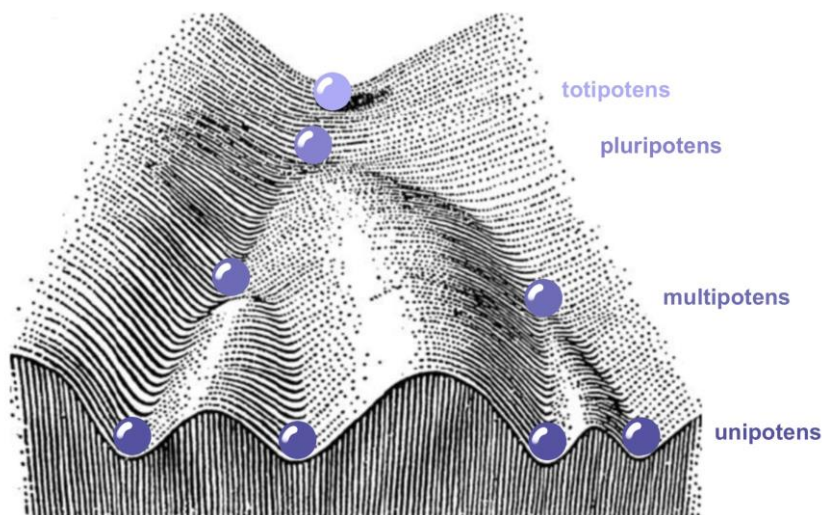
	(quantitative polymerase chain reaction)
R	akceptor molekula
RIN	RNS-integritásérték (RNA integrity number)
RRBS	csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAM	S-adenozil-metionin
SNP	egyponos nukleotid-polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SRA	Szekvenciaolvasó Archívum (Sequence Read Archive)
SRB	szulforodamin B
SSBR	egyszálú DNS-törés javítása (single-strand break repair)
TAC	Transzkriptomelemző Konzol (Transcriptome Analysis Console)
TCGA	Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas)
TET	tíz-tizenegy transzlokáció (ten-eleven translocation)
THF	tetrahidrofolát
TNM	tumor, nyirokcsomó, metasztázis (tumor, node, metastasis)
TS	timidilát-szintáz
uPA	urokináz típusú plazminogén aktivátor
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

2. BEVEZETÉS

2.1. DNS-metiláció

2.1.1. Az epigenetika alapjai

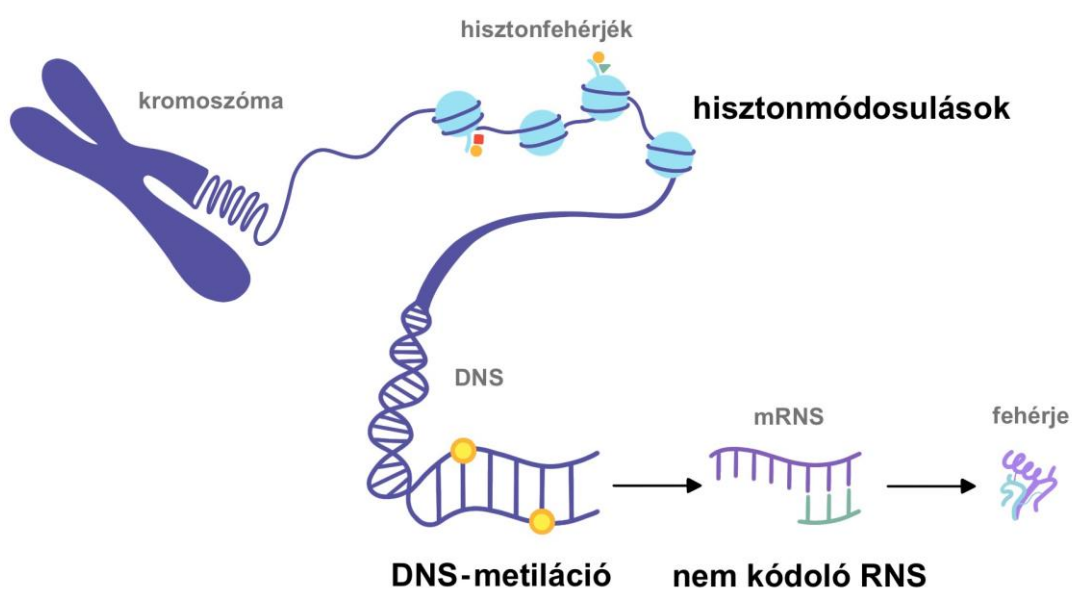
Az epigenetika fogalmát Conrad Waddington alkotta meg 1942-ben [1]. Epigenetikai tájképnek nevezett modellje szerint a sejtek differenciálódásuk során a gének és a környezeti hatások által együttesen kijelölt útvonalon haladnak végig (1. ábra) [2,3]. A görög eredetű epigenetika kifejezés ‘epi’ előtagja (jelentése: valami felett) arra utal, hogy ez a tudományterület a DNS-szekvencián ‘felüli’, tehát magasabb szintű szabályozással foglalkozik. Az epigenetikai módosulások ugyanis képesek úgy befolyásolni a genom által kódolt információ kifejeződését, hogy nem változtatják meg a nukleotidok sorrendjét a DNS-ben [4-6]. Így, habár minden sejtünk ugyanazzal a genetikai állománnyal rendelkezik, megjelenésükben és funkciójukban, azaz fenotípusukat tekintve, lényeges különbségeket mutatnak szövettípusonként [2,4,7-9]. Ez teszi lehetővé a többsejtű élőlények környezethez történő alkalmazkodását [10].



1. ábra. **Conrad Waddington epigenetikai tájképe.** A modell egy völgyekkel tagolt hegyoldalon leguruló üveggömbön keresztül ismerteti a választutakat, amelyek elé a sejtek differenciálódásuk során érkeznek. A végleges fenotípust a környezeti hatások a génekkel kölcsönhatásban alakítják ki. A különböző sejtfejlődési stádiumok a kép jobb oldalán találhatóak. Az ábra Hochedlinger és Plath (2009) alapján módosítva készült [11].

Waddington idejében még nem volt ismeretes az epigenetikai szabályozás pontos molekuláris háttere, de azóta számos kutatásnak köszönhetően világossá vált, hogy a genotípus és fenotípus közötti kapcsolat három módon valósulhat meg:

1. hisztonfehérjéket érintő módosulások által (metiláció, acetiláció, foszforiláció, riboziláció, ubikvitináció, szumoiláció vagy citrullináció);
2. DNS-metilációval;
3. nem kódoló RNS-szakaszok (pl. mikroRNS) segítségével (2. ábra) [10,12].

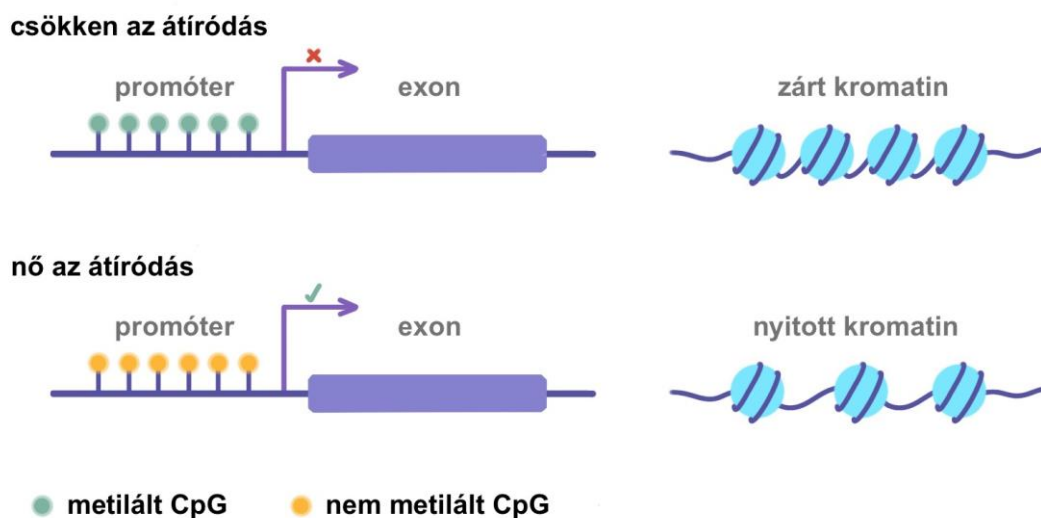


2. ábra. **Az epigenetikai szabályozás formái.** A genetikai kód kifejeződése megváltozhat hisztonmódosulások, DNS-metiláció és nem kódoló RNS-szakaszok által. Az ábra Gerhauser (2013) alapján módosítva készült [13].

2.1.2. A DNS-metiláció szerepe

Az emberi genom leggyakrabban előforduló és egyúttal leginkább kutatott epigenetikai eseménye a DNS-metiláció, ami a promóter szakaszokat érintve a gének elcsendesítéséhez vezet [14,15]. A transzkripció gátlásának két módja van. Az egyik lehetőség a represszor proteinek (pl. hiszton-deacetiláz, hiszton-metiltranszferáz és metilkötő fehérje) toborzása a metiláció helyére, a másik pedig a transzkripciós faktorok promóter régiókhoz történő kötődésének megakadályozása. Végeredményben, erősebbé

válí a hisztonfehérjék (H2A, H2B, H3, H4) és a köré csavarodó DNS közötti kapcsolat, ami növeli ennek a funkcionális egységnek, azaz a kromatinnak a tömörségét (heterokromatin) (3. ábra) [5,16-18].



3. ábra. A promótermetilációs státusz és a génexpresszió között fennálló kapcsolat.

Míg a metilált promóter szakasz a génátíródás csökkenéséhez vezet a kromatin tömörségének növelése által, a promóter-hipometiláció ezzel ellentétes folyamatokat idéz elő. Az ábra Yang és munkatársai (2016) alapján módosítva készült [19]. CpG: cytosine-phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid.

A kromoszóma integritásának szempontjából előnyös, ha a DNS-metiláció az intergénikus szakaszokat csendesíti el [5]. A humán genom 45%-a ugyanis ugráló genetikai elemekből, azaz transzpozonokból áll, amelyek aktiválódásukkal véletlenszerűen épülhetnek be a génekbe, ezáltal mutációkat, valamint genomiális instabilitást előidézve [5,17,20]. Az egyik legismertebb transzpozon a LINE-1 (long interspersed nuclear element-1; hosszú közbeiktatott sejtmagi egység-1), amely egészséges körülmények között erősen metilált. Azonban, ha aktiválódik, az általa kódolt mRNS-ről reverz transzkripció segítségével távoli kromoszomális régiókba épülhet be [21].

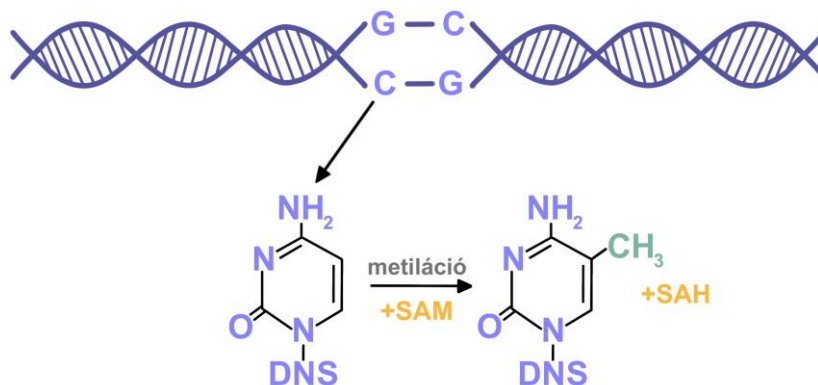
A DNS-metiláció a génexpresszió és a kromatinstruktúra szabályozásán túl szerepet játszik többek között az imprinting mechanizmusában és az X kromoszóma

inaktivációjában is [20]. Az előbbi lehetővé teszi, hogy csak az anyai, vagy csak az apai allél maradjon transzkripcionálisan aktív egy adott gén esetében, míg az utóbbi képes elcsendesíteni az egyik X kromoszómát, hogy ne alakuljon ki aránytalanság a két nem között az átíró gének számában [22].

2.1.3. A DNS-metiláció folyamata

A DNS-metiláció közel 100%-ban a CpG- (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid) helyeken történik meg, tehát olyan citozin nukleobázisokat érint, amelyeket guanin követ a DNS-szekvenciában [5,6,14]. A CpG-helyek leggyakrabban a megközelítőleg 1000 bázispár hosszúságú, konzervált szekvenciával bíró CpG-szigeteken belül találhatók. A DNS-metiláció fontos szabályozási szerepéből kifolyólag a promóterek 70%-a bővelkedik ezekben a genomiális egységekben [5].

A DNS-metil-transzferáz (DNMT) enzimek által katalizált folyamat során a citozin nukleotidok pirimidingyűrűjének 5. szénatomjára metilcsoport kerül, amit az S-adenozil-metioninnak (SAM) nevezett molekula szolgáltat (4. ábra). A keletkezett 5-metil-citozin (5mC) a nukleinsavak csupán 1%-át teszi ki [1,5,14,23-26].



4. ábra. **A DNS-metiláció biokémiai háttere.** A metiláció a guanint megelőző citozin pirimidingyűrűjének 5. szénatomján történik meg. A metilcsoportot az S-adenozil-metionin adja, amely a DNS-metil-transzferáz enzimek által katalizált folyamat során S-adenozil-homociszteinné alakul. Az ábra Wilmanns és munkatársai (1980) alapján módosítva készült [27]. SAH: S-adenozil-homocisztein, SAM: S-adenozil-metionin.

Három folyamat összhangja határozza meg a sejtek DNS-metilációs mintázatát: a kialakító (*de novo*) metiláció, a fenntartó metiláció, valamint a demetiláció [28].

1. Az új metilációs mintázat létrehozásáért a DNMT3a és 3b enzimek felelnek. Az előbbi csaknem minden sejtben megtalálható, míg az utóbbi jellemzően nem expresszálódik a differenciált szövetekben. Tehát a DNMT3b elsősorban az embrionális fejlődéshez szükséges és feltételezések szerint kiemelt szerepet játszik a tumorok kialakulásában is [5,13].
2. A DNMT1 feladata a szülői DNS-szál metilációs mintázatának lemásolása az utódszálakra a replikáció során, ennél fogva fenntartó típusú DNMT-ként tartjuk számon [5,13].
3. A demetilációs folyamat megvalósulhat aktív vagy passzív módon. Az aktív demetilációhoz mindenképpen enzimatis reakció szükséges. Nincs olyan enzim, amelyről egyértelműen ismert lenne, hogy képes hasítani az erős kovalens kötést. Helyette kémiai reakciók sorozata következik be enzimrendszerek közreműködésével, mint amilyen többek között az AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase/ apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide; aktiváció által indukált citidin-deamináz/ apolipoprotein B mRNS szerkesztő enzim, katalitikus polipeptid) vagy a TET (ten-eleven translocation; tíz-tizenegy transzlokáció) [5]. Ezek hatására az 5mC oxidálódik, deaminálódik és dekarboxilálódik, majd egy olyan terméké alakul, amelyet felismer és végül metilcsoport nélküli citozinra cserél a DDR (DNA damage response; DNS-károsodási válasz) útvonal [16]. Passzív demetilációhoz vezet többek között a DNMT1 gátlása vagy hibás működése, amely során a replikáció alkalmával nem kerül metilcsoport az utódszál citozinjára, így minden sejtosztódásnál fokozatosan csökken a DNS-metiláció szintje [12,16,29]. Bár mesterséges úton, de DNMT1-csökkenéshez vezet az akut mieloid leukémia és mielodiszpláziás szindróma terápiájában használatos 5-azacitidin és 5-aza-2'-deoxicitidin (decitabin) is [30]. A két molekula a citozin analójaként épül be a DNS-be. Itt képesek kovalensen megkötni a DNMT1-et, ezáltal előidézve az enzim szabad mennyiségének elégtelen szintjét. Valószínűsíthető, hogy ezek a kezelőszerek a következményesen kialakuló tumorszuppresszor gén-reaktiválás és a DNS-hibák létrehozása által fejtik ki jótékony hatásukat [30,31].

2.1.4. A táplálkozás hatása a DNS-metilációra, valamint a tumorképződésre

A DNS-metilációs mintázat, az ún. metilom, az élet korai szakaszában kialakul és dinamikusan változik a környezeti tényezők függvényében [12]. Ezáltal lehetővé válik, hogy a módosulásokra nem képes DNS-szekvenciában kódolt információ folyamatosan reagálhasson a különböző behatásokra [10,17]. A DNS-metilációs változások reverzibilis folyamatként ígéretes daganatterápiás lehetőségek alapját képezhetik, ezért napjainkban nagy figyelem irányul rájuk [10,14,32].

A metilomot befolyásoló környezeti faktorokat négy nagy csoportba oszthatjuk: élőhelyi hatások/foglalkozási ártalmak, életmódbeli tényezők, gyógyszeres terápiák, valamint a táplálkozási szokások [10,33,34]. Tanulmányunkban elsősorban a táplálkozás epigenetikai hatását elemeztük, mivel a sejtkárosítók során általunk használt molekulák (folsav, SAM) ismert étrend-kiegészítők. Emellett a szervezetben mért szintjüket számottevően befolyásolja az étkezés [16,35-38].

Régóta ismert, hogy az egészséges táplálkozás és a daganatok előfordulási gyakorisága között fordított arányosság áll fenn. A feldolgozott húsok, zsíros, olajos ételek, túlfinomított szénhidrátok, emellett kevés zöldség, gyümölcs, ásványi anyagok fogyasztása hozzájárul a karcinogenezishez [39]. Ezt igazolja többek között az a tény is, miszerint a túlsúlyos emberek körében gyakrabban alakulnak ki a daganatos megbetegedések [40]. Az étrend elsősorban az epigenom befolyásolásán keresztül hat a tumorok kifejlődésére [39]. Az ezzel foglalkozó tudományterület a nutrieptigenetika/epigenomika, amely kiemelten hangsúlyozza a tápanyagok bevitelének jótékony szerepét olyan betegségek esetében, amelyekben aberráns DNS-metiláció figyelhető meg [12,13,16].

Kimutatták, hogy az étkezés globálisan és CpG-helyre specifikusan is képes hatni a DNS-metilációra. Ez a metildonor molekulák kialakulásának elősegítése, a kofaktor funkciók betöltése, továbbá a DNMT-k vagy a demetilázok aktivitásának szabályozása által valósulhat meg [16,38,41]. Metildonor vagy kofaktor szereppel bírnak olyan mikrotápanyagok, mint a kolin, a betain, a metionin, vagy a B-vitaminok közül a B₂ (riboflavin), a B₃ (niacin), a B₆ (piridoxin), a B₉ (folát) és a B₁₂ (kobalamin) [16,38,39]. Ezek a molekulák végeredményben a SAM-szintet befolyásolják, így elfogyasztott

mennyiségük egyértelműen korrelál a DNS-metiláció mértékével [16,38]. A DNMT enzimek ismert természetes gátlószerei közé tartozik a zöld tea polifenolja, az epigallokatein-3-gallát, a szója izoflavonoidja, a genistein, a főként zöldségekben és gyümölcsökben megtalálható kvercetin, rezveratrol és szulforafán, valamint a köztudottan antitumor hatással bíró kurkumin [16,39,42-44]. Ezen bioaktív vegyületek mindegyikéről bebizonyították már, hogy a DNMT-k gátlásán keresztül képesek reaktiválni a tumorsuppresszor géneket a daganatokban [39]. A TET enzimek kofaktorként α -ketoglutarátot használnak a működésükhöz, így azok a táplálékkiegészítők, amelyekben megtalálható ez a fehérje, befolyásolják a demetiláció mértékét [16,45].

Az előbb felsorolt mikrotápanyagok és bioaktív vegyületek az epigenom szabályozása által kemopreventív és kemoterápiás tulajdonsággal bírnak [39]. Azonban számos állatkísérlet, illetve epidemiológiai vizsgálat bizonyítja, hogy elégtelen mennyiségben történő fogyasztásuk aberráns DNS-metilációs mintázathoz vezet, amely növelheti bizonyos daganatok (máj, vastagbél, emlő, nyelőcső, gyomor) előfordulási gyakoriságát [16,17,38,40,46,47].

2.1.5. Az öregedés hatása a DNS-metilációra, valamint a tumorképződésre

Habár a fiatal sejtek célja a megfelelő DNS-metilációs mintázat által biztosított kompakt kromatinsztruktúra fenntartása, számos kutatás igazolja, hogy az öregedéssel egy progresszív rendezetlenség következik be [1,7]. A jelenséget, amelyet epigenetikai sodródásnak hívunk, egyaránt jellemzi a promóter régiókat érintő fokozott metiláció (hipermetiláció), valamint a globális, tehát genomszintű DNS-metiláció csökkenése (hipometiláció) [7,48]. Míg az előbbi a DNMT3a és DNMT3b emelkedett aktivitása miatt következik be, az utóbbi háttérében elsősorban a DNMT1 hibás működése áll [1,7,10,16].

Az öregedéssel járó DNS-metilációs változásokat korfüggő, vagy más néven A-típusú (age-related; öregedéshez társult) metilációnak nevezzük [49]. Az ezen alapuló korbecslő vizsgálatok sokkal ígéretesebben határozzák meg a kronológiai életkort, mint a transzkriptomikai és proteomikai módszerek, vagy akár a telomerhossz mérésére irányuló elemzések [6,50,51]. Steve Horvath 353 CpG-dinukleotid metilációs státuszának figyelembevételével alkotott meg egy mára már széles körben alkalmazott korbecslő

eljárást, az úgynevezett epigenetikai órát. Ennek használatával megfigyelhető, hogy az öregedéssel összefüggő betegségekben, pl. az Alzheimer-kórban, a kardiovaszkuláris kórképekben és különböző daganatoknál, a számított biológiai életkor a valós kronológiai értékhez képest lényegesen magasabb [50,51]. A tumorok esetében a különbség átlagosan akár 36 évet is jelenthet [10,52]. Az epigenetikai órák ebből kifolyólag hasznosak lehetnek bizonyos betegségek kialakulási kockázatának megítélésében, valamint a várható élettartam előrejelzésében is [50,51]. Továbbá az ismertetett folyamatok megértése hozzájárulhat ahhoz, hogy a későbbiekben lehetővé váljon az öregedéssel összefüggő metilációs mintázat visszafordítása, és ezáltal az élettartam növelése is [6,7].

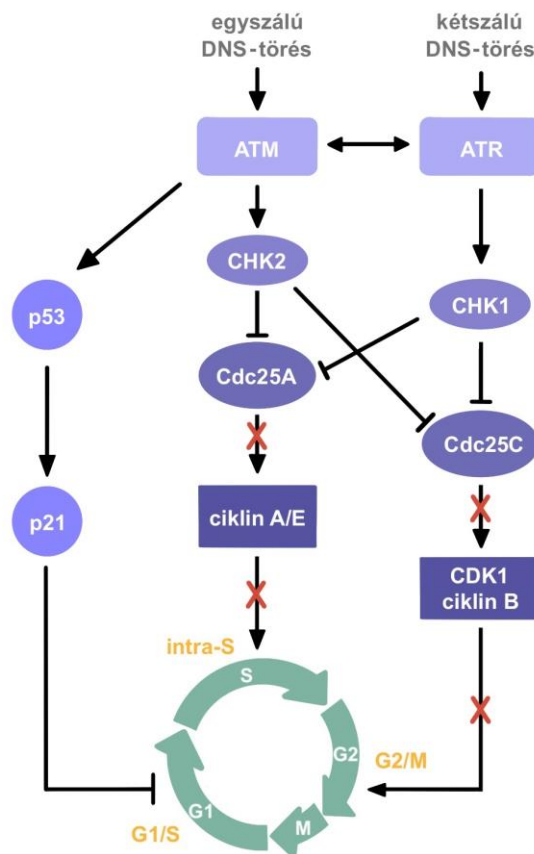
A daganatos szövetek (pl. vastagbél-, tüdő-, prosztata- és emlőrák esetén) DNS-metilációs mintázatában az öregedéssel kapcsolatos változásokhoz hasonló folyamatok következnek be [1,14,38,53]. A promóterben található CpG-szigetek hipermetilációja a tumorsuppresszor gének elcsendesítése révén segíti elő a sejtek kontroll nélküli osztódását [14,16,17,53]. A globális hipometiláció azonban az onkogének fokozott expressziója, valamint a genomiális instabilitás növelése által vezet daganatos progresszióhoz [17,20,54]. Ezt a jelenséget rákfüggő, azaz C-típusú (cancer-related; karcinogenezishez társult) metilációnak hívjuk [49].

2.2. Genomiális instabilitás

2.2.1. DNS-hibajavító útvonalak

Az emberi test minden sejtjében naponta megközelítően 70.000 DNS-károsodás alakul ki [55]. A károsító tényezők lehetnek sejteredetűek (endogén), mint pl. a reaktív oxigénszármazékok, vagy érkezhettek a környezetből (exogén), mint amilyen az UV-sugárzás, ionizáló sugárzás, vagy a toxikus anyagok [18,56]. Ezeknek az elhárítását szolgálják a DDR útvonalak, amelyek a behatások sokféleségéből adódóan különböző mechanizmusok által működnek. Az egy DNS-szálat érintő károsodás javítására számos folyamat szolgál, mint pl. az MMR (mismatch repair; össze nem illő nukleotidpárok javítása), a BER (base excision repair; báziskivágó javítás), a NER (nucleotide excision repair; nukleotidkivágó javítás) vagy az SSBR (single-strand break repair; egyszálú DNS-törés javítása). A két DNS-szál érintettségének kijavítására a HR (homológ rekombináció) és a NHEJ (non-homologous end-joining; nem homológ végek

összekapcsolása) útvonalak lépnek működésbe [56]. A hibajavítás fő mediátorai az ATM (ataxia teleangiectázia mutált) és ATR (ataxia teleangiectázia és Rad3 rokon) kinázok. Amellett, hogy megkezdik a hibajavító enzimek toborzását a károsodás helyére, szerepet játszanak a ciklin-dependens kinázok aktivitásának csökkentésében is a CHK1 (checkpoint kinase 1; ellenőrzőpont-kináz 1) és CHK2 (checkpoint kinase 2; ellenőrzőpont-kináz 2) kinázok közreműködésével [56,57]. Ez utóbbi folyamat a sejtciklus lelassulásához vagy megállásához vezet a G1/S-, az intra-S-, vagy a G2/M-ellenőrzőpontokon, hogy megfelelő időt biztosítson a DNS hibáinak kijavítására a sejtosztódás előtt. Amennyiben nem sikerül a hibajavítás, bekövetkezik az apoptózis, vagy a sejt nyugvó állapotba (szeneszcencia) lép (5. ábra) [56,58,59].



5. ábra. A DNS-károsodásra reagáló (DDR; DNA damage response) útvonal működése. Az ATM és ATR kinázok az egyszálú és kétszálú DNS-törések hatására lépnek működésbe. A p53-aktiváció következtében megemelkedő p21-szint a sejtciklus G1/S-fázisban történő megállásához vezethet. A CHK1 és CHK2 kinázok foszforilálják a Cdc25 foszfatázokat, így inaktíválva őket. Ez a folyamat gátolja meg végül a CDK-

ciklin komplexek aktiválódását, ami a sejtciklus S-fázisban és G2/M-határon történő megállását okozza. A DNS-t érő károsító hatások fajtájától függően átfedések alakulhatnak ki az ATM és ATR útvonalakban, amit a kétirányú aktiválás ($\leftrightarrow$) és a keresztirányú gátlások ($-$) jelölnek. Az ábra Weber és Ryan (2015), valamint Yusoh és munkatársai (2020) alapján módosítva készült [57,60]. ATM: ataxia teleangiectázia mutált, ATR: ataxia teleangiectázia és Rad3 rokon, Cdc25A: cell division cycle 25A; sejtosztódás ciklus 25A, Cdc25C: cell division cycle 25C; sejtosztódás ciklus 25C, CDK1: cyclin-dependent kinase 1; ciklinfüggő-kináz 1, CHK1: checkpoint kinase 1; ellenőrzőpont-kináz 1, CHK2: checkpoint kinase 2; ellenőrzőpont-kináz 2.

A legsúlyosabb DNS-t érintő károsodás, az ún. DNS-kettőstörés, amely a kettős hélix mindkét szálának törésével jár [55,61]. A kijavítását célzó útvonalak akár 900 különböző fehérje foszforilálódásához is vezethetnek [61]. Az egyik ilyen módon aktiválódó fehérje a H2A hiszton egyik variánsa, a H2AX, ami a DNS-ben elszórtan található meg [18]. A H2AX a javítási folyamatok egyik kulcsproteinje, ugyanis azáltal, hogy ATM hatására foszforilálódik, γ -H2AX-é alakul, és megkezdődik a többi fehérje toborzása a károsodás helyére [18,62]. Eközben a törésnél átrendeződik a kromatinstruktúra, amely segíti a helyreállításban részt vevő enzimek törött végekhez való hozzáférését [55].

Ha egy sejtben nem működik megfelelően a hibajavítás, érzékenyebbé válik a károsító hatásokra [56]. Az életkor előrehaladtával megfigyelhető a DDR működésének folyamatos hanyatlása, ami a DNS-hibák számának emelkedésével és a genom integritásának csökkenésével jár [59]. Ezáltal az érintett sejtek növekedési előnyre tehetnek szert és malignus átalakuláson esnek át [21]. Nem meglepő tehát, hogy a daganatok többségében károsodott a DDR-rendszer [55,56,61]. A tumorellenes kezelések (kemoterápia, radioterápia) nagy része ezt a hiányt kihasználva a DNS-hibák létrehozása által éri el hatását. Az a daganat, amelyben nem effektív a hibajavítás, jól reagál a terápiára, azonban a magas DDR-aktivitás rezisztenciával járhat együtt [56].

2.2.2. A genomiális instabilitás formái

A genom integritásának csökkenése, azaz a genomiális instabilitás három formában nyilvánulhat meg. Ezek akár együttesen is fennállhatnak egy daganaton belül, ami a sejteknek eltérő genetikai hátteret kölcsönöz, így létrehozva a tumor heterogenitást

jelenségét [58,63].

1. Leggyakrabban a kromoszomális instabilitással (CIN; chromosomal instability) találkozunk, ami nagy kromoszomális egységek, vagy akár teljes kromoszómák nyeresével és vesztésével jár [64-66]. A rendellenes kromoszómaszám (aneuploidia) hátterében a sejtosztódáskor nem megfelelően végbemenő kromoszomális szétválás áll [67]. A szolid daganatok 70-90%-ában megfigyelhető ez az eltérés, így ők a CIN+ tumorok csoportját alkotják [68].
2. A genomiális instabilitás következő formája a mikroszatellita-instabilitás (MSI), amiért az MMR gének (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) hibás működése tehető felelőssé [63,65,69]. A mikroszatellitákat 1-6 bázispár hosszúságú ismétlődő szakaszok alkotják [70]. MSI esetén ezek a szekvenciák egymás után akár százszorosan is megsokszorozódnak, ami instabil meghosszabbodásukhoz és ezáltal kereteltolódásos mutációkhoz vezet [63,65,71,72]. Az MSI-státusz meghatározására a BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250 di- és trinukleotid-ismétlődések vizsgálata alkalmas. Amennyiben az egyikük instabil, MSI-L (low; alacsony), 2 vagy több instabilitása esetén azonban MSI-H (high; magas) daganatról beszélünk. MSS (mikroszatellita stabil) státusz akkor áll fenn, ha egyik lókuszt sem érintett [73].
3. A genomiális instabilitás harmadik formája a korábban említett C-típusú metiláció során megfigyelhető aberráns promóter-hipermetiláció [63,65]. Különböző paneleket használnak a CIMP (CpG island methylator phenotype; CpG-sziget metilátor fenotípus) státusz fennállásának meghatározása céljából [49]. A metilált promóterrel rendelkező marker gének száma alapján beszélhetünk CIMP- és CIMP+ tumorokról, valamint a pozitív csoporton belül elkülöníthetünk magasabb (CIMP-H; high) és alacsonyabb (CIMP-L; low) metiláltsági értéket mutató alcsoportokat is [49,74,75].

2.2.3. A genomiális instabilitás vizsgálómódszerei

A genomiális instabilitást különféle módszerekkel lehet mérni, amelyek közül a mikronukleusz-számolás az egyik legismertebb [59,76]. A mikronukleuszok kis sejtmagon kívüli testek, amik károsodott kromoszómafragmenseket, vagy egész kromoszómákat tartalmaznak. A genomiális instabilitás következtében ezek a

makromolekulák a sejtsztódás során nem kerülnek be a sejtmagba, hanem magmembránba csomagolódva önálló egységeket képeznek. Festődésük hasonló a sejtmagéhoz, de sokkal kisebb méretűek [76,77]. Számuk jól korrelál a kettőstörések mennyiségével és a kromoszómális instabilitás mértékével [77,78]. A kettőstörések azonosítására a mikronukleuszok számának meghatározása mellett a γ -H2AX fehérjék immunfestése, valamint az ún. comet próba is kitűnően használható. A comet módszer alkalikus formája a kétszálú törések mellett az egyszálú töréseket is érzékeli [18]. A vizsgálat egy olyan egysejtes elektroforézist takar, amely során a negatív töltésű DNS-fragmensek gyorsabban vándorolnak az anód irányába, mint a nem károsodott szakaszok. Így a mozgó részek mennyiségének vizsgálatával könnyen megítélhető a DNS-törések száma [79,80].

2.3. A vastagbélrák

2.3.1. A vastagbélrák klinikai vonatkozásai

A GLOBOCAN (Global Cancer Observatory; Globális Rákobszervatórium) 2020-as adatai alapján a vastagbélrák (CRC; colorectal cancer) az emlő és tüdőrák után a 3. leggyakoribb daganatos megbetegedés a világon, évi csaknem kétmillió felfedezett esettel. Nőkben a tumorok 9,4%-áért, férfiakban pedig 10,6%-áért felelős. A CRC évente közel egymillió ember halálához köthető világszerte, így a tüdőrák után második helyet foglal el a daganatok okozta halálozások listáján. Magyarország sajnálatos módon élen jár a világon a CRC előfordulásában, ugyanis 100.000 lakosra vetítve hazánkban a legmagasabb az érintett személyek száma (45,3 fő) [81]. Leggyakrabban a fejlett országok lakosainak körében figyelhetjük meg ezt a betegséget, de az incidencia évről-évre egyre nagyobb ütemben emelkedik a fejlődő országokban is [82]. Főként a 60-79 év közöttieket érinti, 40 éves kor alatt azonban ritka, leginkább csak tumorszindrómákhoz társultan fordul elő [83]. Ezek az örökletes CRC-formák az összes eset csupán 10%-át teszik ki, a daganat ugyanis jellemzően sporadikus megjelenést mutat [72].

A WHO (World Health Organization; Egészségügyi Világszervezet) szövettanilag a CRC-k nagy hányadát (90%) a nem osztályozható adenokarcinóma csoportba sorolja, amely mellett kisebb százalékban megfigyelhetünk mucinózus, mikropapilláris, fogazott (serrated), adenómaszerű és adenoszkvamózus adenokarcinómát, pecsétgyűrűsejtes,

medulláris és differenciálatlan karcinómát, valamint karcinómát szarkomatoid komponenssel [82].

Jelenleg a CRC stádiummeghatározás a TNM (tumor, node, metastasis; tumor, nyirokcsomó, metasztázis) rendszeren alapul az AJCC (American Joint Committee on Cancer; Amerikai Rákellenes Tanács) ajánlásai szerint. Az osztályozás a primer tumor kiterjedtsége (pT; primary tumor), a regionális nyirokcsomók érintettsége (pN; regional lymph node) és a távoli metasztázisok jelenléte (pM; distant metastasis) szerint 11 stádiumot különít el, amelyek az 1. táblázatban láthatók [84].

1. táblázat. **A vastagbél-daganatok stádiummeghatározása.** A primer tumor kiterjedtsége (pT; primary tumor), a regionális nyirokcsomók érintettsége (pN; regional lymph node) és a távoli metasztázisok jelenléte (pM; distant metastasis) alapján 11 stádium különíthető el. A táblázat az AJCC Cancer Staging Manual (2017) alapján módosítva készült [84]. pT0: nincs primer tumor, pTis: *in situ* karcinóma (intramukózális karcinóma), pT1: a tumor a szubmukózába terjedt, pT2: a tumor a bélfal simazomrétegébe terjedt, pT3: a tumor a zsírszövetbe terjedt, pT4a: a tumor a vizszerális peritoneumra terjedt, pT4b: a tumor beszűrte a környező szerveket vagy szöveteket, pN0: nincs regionális nyirokcsomóáttét, pN1a: áttét egy regionális nyirokcsomóban, pN1b: áttét 2-3 regionális nyirokcsomóban, pN1c: nincs nyirokcsomóáttét, de a perikolikus zsírszövetben tumordepozitum észlelhető, pN2a: áttét 4-6 regionális nyirokcsomóban, pN2b: áttét 7 vagy több nyirokcsomóban, pM0: nincs kimutatható távoli áttét, pM1a: távoli áttét van egy szervben és nincs peritoneális áttét, pM1b: távoli áttét van kettő vagy több szervben és nincs peritoneális áttét, pM1c: kimutathatók peritoneális áttétek.

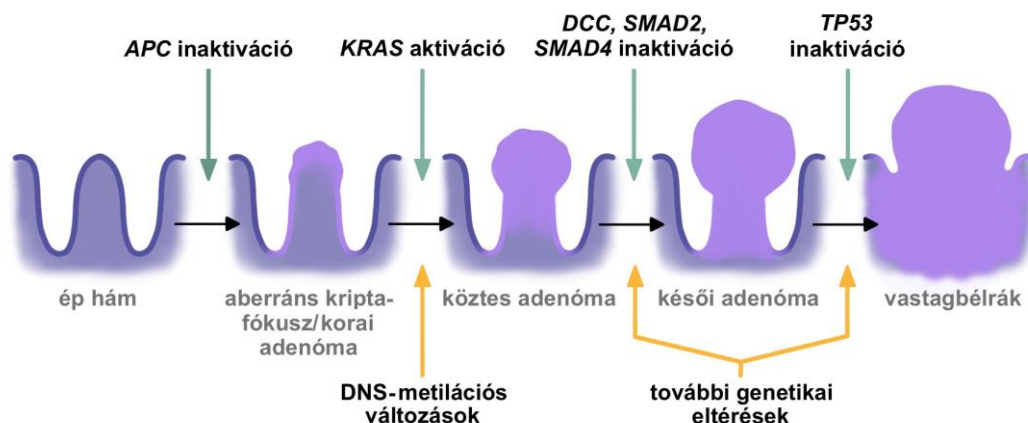
Stádium 0	pTis	pN0	pM0
Stádium I	pT1-T2	pN0	pM0
Stádium IIA	pT3	pN0	pM0
Stádium IIB	pT4a	pN0	pM0
Stádium IIC	pT4b	pN0	pM0
Stádium IIIA	pT1-pT2	pN1/pN1c	pM0
	pT1	pN2a	pM0
Stádium IIIB	pT3-pT4a	pN1/pN1c	pM0
	pT2-pT3	pN2a	pM0
	pT1-pT2	pN2b	pM0
Stádium IIIC	pT4a	pN2a	pM0
	pT3-pT4a	pN2b	pM0
	pT4b	pN1-pN2	pM0
Stádium IVA	bármelyik pT	bármelyik pN	pM1a
Stádium IVB	bármelyik pT	bármelyik pN	pM1b
Stádium IVC	bármelyik pT	bármelyik pN	pM1c

A betegek túlélését jelentősen befolyásolja a TNM-rendszer által meghatározott stádium. Míg az I-es stádiumú betegek 5 éves túlélése 93,2%, IV-es stádium esetén ez csupán 8,1%. Habár a TNM a legelterjedtebb osztályozó rendszer, amit a prognózis és a kezelés meghatározásakor figyelembe vesznek, önmagában nem elégséges [85]. A daganatok genetikai és epigenetikai jellemzőinek ezen felül történő vizsgálatával azonban lehetővé válik a terápiás célpontok azonosítása, valamint az eredményesebb gyógyítás [85-87].

2.3.2. A vastagbélrák molekuláris háttere

A vastagbélrákok progressziója során rendezett elv szerint alakul át a normál hám adenómává, majd karcinómává [88]. Ezt a többlépcsős folyamatot, amelyet adenóma-karcinóma szekvenciának hívnak, először Fearon és Vogelstein írta le 1990-ben. Első lépése az *APC* tumorszuppresszor gén inaktivációja, ami azáltal, hogy szelektív növekedési előnyt biztosít a hámsejteknek, adenóma kialakuláshoz vezet [63]. Emellett szintén korai eseménynek tekinthető a DNS globális hipometilációja is [89,90]. A késői adenóma stádium, majd a rák kialakulásához összesen legalább hét gén érintettsége szükséges, amely magában foglalja a tumorszuppresszor gének (pl. *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*, *TP53*) inaktivációját és/vagy az onkogének (pl. *KRAS*, *PIK3CA*) aktivációját [63,72,91,92] (6. ábra). A génekben bekövetkező zavarok sorrendje szekvenciális, így pl.

a *KRAS* mutáció önmagában nem képes a progresszió elindítására, csak ha már az *APC* is inaktiválódott. Fearon és Vogelstein óta már egyéb, a fogazott adenómák kialakulásához köthető útvonalat is azonosítottak (serrated útvonal), ami kezdeti *MAPK* aktivációval jár, így az előbb ismertetett modell nem illeszthető rá [72].



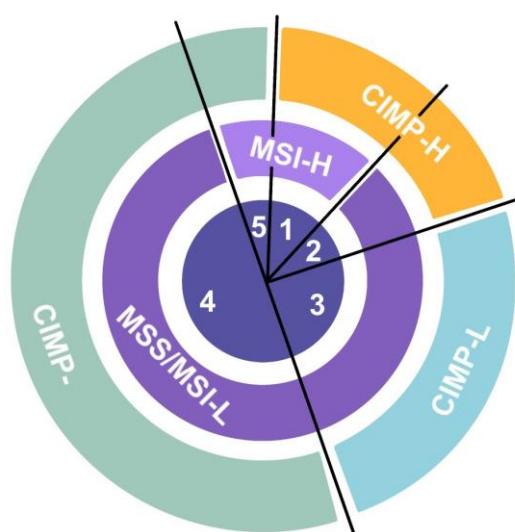
6. ábra. A Fearon és Vogelstein által leírt adenóma-karcinóma szekvencia. A vastagbélrák kialakulásának többlépcsős modelljében a kezdeti *APC* inaktivációt követően genetikai és epigenetikai változások, valamint az onkogének aktivációja és a tumorsuppresszor gének inaktivációja figyelhető meg. Az egymást követő lépések az ép vastagbélhám korai, köztes és késői adenomastádiumokon keresztül karcinóma kialakulásához vezetnek. Az ábra Thomas (2012), valamint Markle és munkatársai (2010) alapján módosítva készült [93,94].

A CRC-k molekuláris felosztását meghatározza jellemző genomiális instabilitásuk formája, ami alapján 85%-uk CIN, 15%-uk pedig MSI csoportba sorolható [49,68,69]. A két útvonal gyakorlatilag kizárja egymást, ezért a CIN tumorok MSS-ként is azonosíthatóak [49,95]. A fennálló genomiális instabilitás típusa jelentős hatással van a prognózisra, ugyanis a CIN betegeknél 15%-kal alacsonyabb túlélés figyelhető meg az MSI-hez viszonyítva [69]. Habár csekély számban, de mindkét útvonalnál előfordulhat a sporadikus típus mellett örökletes forma is. CIN esetében az *APC* inaktivációval járó FAP (familiális adenomatózus polipózis, 1%), MSI esetében pedig az MMR gének csírasejtes mutációjára visszavezethető HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer; hereditér nonpolipózis kolorektális karcinóma, 1-3%), vagy más néven Lynch-

szindróma rendelkeznek az adott státuszra jellemző genetikai karakterisztikával [85]. A két említett folyamat mellett a CIMP egy párhuzamos kategóriát képvisel, ugyanis a 7. ábrán látható módon mind a CIMP-pozitivitás, mind a CIMP-negativitás átfedésben van a CIN és MSI osztályozással [95]. Ez alapján 5 kategóriát különböztethetünk meg:

1. MSI-H és CIMP-H (12%): *MLH1* metiláció és *BRAF* mutáció jellemzi, fogazott adenómákból alakul ki, főként a proximális vastagbélre lokalizált, és gyakrabban figyelhető meg nőkben;
2. MSS/MSI-L és CIMP-H (8%): hasonló jellegzetességekkel rendelkezik, mint az előző csoport tagjai;
3. MSS/MSI-L és CIMP-L (20%): *KRAS* és *TP53* mutáció, valamint aneuploidia jellemzi, fogazott adenómákból, tubuláris, villosus és tubulovillosus adenómákból is kialakulhat, főként a disztális vastagbélre lokalizált, és gyakrabban figyelhető meg férfiakban;
4. MSS és CIMP– (57%): *APC*, *KRAS* és *TP53* mutáció, valamint aneuploidia jellemzi, tubuláris, villosus és tubulovillosus adenómákból alakul ki, főként a disztális vastagbélre lokalizált, és gyakrabban figyelhető meg férfiakban;
5. MSI-H és CIMP– (3%): *APC* és *KRAS* mutáció jellemzi, tubuláris, villosus és tubulovillosus adenómákból alakul ki, főként a proximális vastagbélre lokalizált, és gyakrabban figyelhető meg nőkben [95].

A felsorolásból megállapítható, hogy az 1-es és 2-es csoportba sorolható CIMP-H tumorok nagy hasonlóságot mutatnak a mikroszatellita-státuszuktól függetlenül is. Esetükben kiemelt jelentőséggel bír az *MLH1* MMR gén metiláció által történő inaktiválása [49,72,74,95,96].



7. ábra. **A vastagbélrákok molekuláris felosztása.** Az 5 különböző csoport a daganatok jellemző genomiális instabilitása alapján különíthető el. Az ábra Jass (2007) alapján módosítva készült [95]. CIMP–: negative CpG island methylator phenotype; nem áll fenn CpG-sziget metilátor fenotípus, CIMP-H: high level CpG island methylator phenotype; magas szintű CpG-sziget metilátor fenotípus, CIMP-L: low level CpG island methylator phenotype; alacsony szintű CpG-sziget metilátor fenotípus, MSI-H: high microsatellite instability; magas mikroszatellita instabilitás, MSI-L: low microsatellite instability; alacsony mikroszatellita instabilitás, MSS: mikroszatellita-stabil.

2.3.3. A vastagbélrák molekuláris patológiai osztályozása

A CRC-knek jelenleg két molekuláris patológiai osztályozása létezik. Az egyik, szekvenálási és array-alapú technikákra támaszkodva, a TCGA (The Cancer Genome Atlas; Rákgenom Atlasz) keretein belül készült el. Ezen klasszifikáció alapján az első csoportot a hipermutált tumorok alkotják (16%), amelyek vagy az MMR gének zavart működéséhez társulva alakulnak ki (13%), vagy *POLE*, *POLD1* mutációval járó ultramutált karcinómák (3%). A második csoportba (84%) a nem hipermutált daganatok sorolhatóak, amelyek jellemzően MSS-ek és gyakran mutatható ki bennük *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4* és *TP53* mutáció [97,98].

A másik osztályozás egy konzorciumi együttműködés eredménye, amely több transzkriptomikai vizsgálat adatait egyesítve 4 CMS (consensus molecular subtype;

konszenzus molekuláris alcsoport) kategória megalkotásához vezetett. Ebben a klasszifikációban a TCGA alapú osztályozás hipermutált tumorai a CMS1 csoportba estek, míg a CIN daganatokat a CMS besorolás három különböző csoportra osztotta [97-100]. A CMS1-et (immun, 14%) az immunválasz, a CMS2-t (kanonikus, 37%) a Wnt, a CMS3-at (metabolikus, 13%) a metabolikus, a CMS4-et (mezenchimális, 23%) pedig a TGF β /integrin útvonalak transzkripcionális aktivációja jellemzi. A legrosszabb prognózis a CMS4 kategóriához társítható, ugyanis ezek a daganatok az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) mellett erőteljes stromális invázióval és angiogenezissel jellemezhetők [82,101-103]. A CRC-k 13%-a a tumor heterogenitás miatt több CMS csoport jellegzetességeit is mutatják, így ők a “kevert” kategóriába sorolandók [97].

Habár ezeket a molekuláris patológiai rendszereket érdemes további vizsgálatokkal validálni, a személyre szabott orvoslás térhódításával, a TNM-stádiumok meghatározása mellett, nagy segítséget nyújthatnak a jövőben az optimális kezelési protokoll és a célzott terápia megtervezésében [97,101,104].

2.4. A folsav és az S-adenozil-metionin

2.4.1. A metildonor molekulák szerepe

A metildonor molekulák és a metabolizmusukban szerepet játszó enzimek működéséhez szükséges kofaktorok (leggyakrabban B-vitaminok) a SAM mennyiségének befolyásolása által hatással vannak a szervezet epigenetikai mintázatára [16,38,39]. A SAM képződése egy komplex biológiai rendszeren keresztül történik meg, amelyet egy szénatomos (1C; one-carbon) metabolizmusnak neveznek. Ebben a folyamatban egy szénatommal rendelkező csoportok szállítódnak a donor molekulákról az akceptor molekulákra a nukleotidok és az aminosavak szintézise, továbbá a DNS, az RNS, a fehérjék és a foszfolipidek metilációja céljából [16,38]. Az 1C metabolizmus a folát ciklus, a metionin ciklus, valamint a transzszulfurációs útvonal összefonódásából áll, és egyszerre zajlik a citoplazmában, a sejtmagban és a mitokondriumban [39].

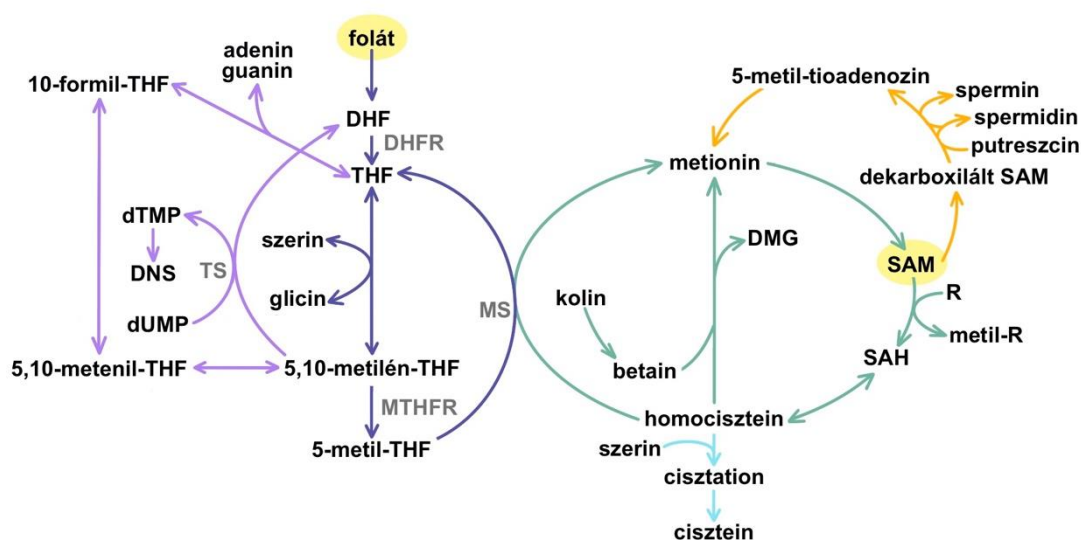
A folát ciklus első lépése a táplálékkal felvett folát átalakítása dihidrofoláttá (DHF), majd tetrahidrofoláttá (THF) a DHF-szintetáz és a DHF-reduktáz (DHFR) enzimek által. A THF-et a szerin-hidroximetil-transzferáz enzim 5,10-metilén-THF-fé alakítja egy olyan

reakció során, amelyben a szerin és glicin aminosavak szolgálnak 1C donorként [16,38]. Ezt követően a képződött molekula 5-metil-THF-fé redukálódik az 5,10-metilén-THF-reduktáz (MTHFR) enzim segítségével [16]. Miközben az 5-metil-THF visszaalakul THF-fé a metionin-szintáz (MS) által katalizált folyamatban, metilcsoportját átadja a homociszteinnak, így hozzájárulva a már metionin ciklus részét képező molekula, a metionin szintéziséhez [16,33,39]. A metionin a SAM prekursora a metionin-adenozil-transzferáz (MAT) enzim révén megvalósuló reakcióban [16,38,39]. A SAM-ról a metilcsoport a DNS citozinjának 5. szénatomjára kerülve epigenetikai szabályzó funkciót lát el [16]. Emellett azonban ez az univerzális metildonor-molekula részt vesz az RNS, a fehérjék és a foszfolipidek metilációjában is [38]. A SAM a metiltranszfert követően a glicin-N-metil-transzferáz enzim segítségével S-adenozil-homociszteinné (SAH) alakul át, ami egy reverzibilis folyamat során azonnal homociszteinné hidrolizálódik. A SAH nagyobb affinitással kötődik a DNMT-hez, mint a SAM, ezért, ha a homocisztein nem metabolizálódik tovább, a SAH felhalmozódik és a metilációs folyamat gátlásához vezet. A negatív szabályozó molekulaként működő homocisztein szintje csökken, ha metioninná történő remetilációval visszakerül az ismert metionin ciklusba. Erre a metionin-szintáz mellett a betain-homocisztein-metiltranszferáz enzim biztosít lehetőséget, ami a betain és kolin (betainná történő oxidáció után) metilcsoportját használva metionin és dimetilglicin képződéshez vezet [16,39]. A homocisztein szintje a metilációs reakciók mellett a transzszulfurációs útvonal hatására is csökkenhet. A főként májban és szemlencsében végbemenő folyamat hatására cisztation, majd cisztein képződik, ami a taurin és a glutation prekursora [25,39,105].

A SAM, bár kevesebb, mint 5%-ban, de felhasználódhat a sejtek növekedésében és fejlődésében szerepet játszó poliaminok szintézisére is. SAM-dekarboxiláz hatására dekarboxilált SAM-má alakul, miközben a keletkező aminopropil csoport a putreszcin vagy spermidin poliaminokra kerül. A kiindulási molekula többi része azonban 5-metiltioadenozinná, majd újra metioninná alakul [25,106].

A folát ciklus a metilációs folyamatokban betöltött szerepe mellett elengedhetetlenül fontos a *de novo* nukleotidszintézishez. A körfolyamat elején a THF 10-formil-THF-fé alakulhat, hogy a foszforibozil-glicinamid-formiltranszferáz és az 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid-formiltranszferáz enzimek segítségével a purinvázis

nukleotidok (adenin és guanin) 2-es és 8-as szénatomját biztosítja [38,107,108]. Az 5,10-metilén-THF pedig a timidilát-szintáz (TS) által megvalósuló folyamatban adja 1C csoportját a pirimidinváz képződéséhez, miközben DHF-fé oxidálódik. Az utóbbi reakció kiindulási molekulája a dezoxi-uridin-monofoszfát (dUMP; deoxyuridine monophosphate), ami a DNS-szintézishez szükséges dezoxi-timidin-monofoszfáttá (dTMP; deoxythymidine monophosphate) alakul át (8. ábra) [108,109].



8. ábra. Az egy szénatomos metabolizmus és a hozzá kapcsolódó biokémiai folyamatok. A táplálékkal felvett folátok a folát (sötét lila) és metionin (zöld) cikluson keresztül felhasználódhatnak az S-adenozil-metionin szintézisére. Ezt a két körfolyamatot egészíti ki a transzszulfurációs (kék) és aminopropilációs (sárga) útvonal, továbbá a folátmetabolitok által megvalósuló nukleotidszintézis (világos lila). Az ábra Bhargava és munkatársai (2012), valamint Sanderson és munkatársai (2019) alapján módosítva készült [110,111]. 5,10-metenil-THF: 5,10-metenil-tetrahidrofolát, 5,10-metilén-THF: 5,10-metilén-tetrahidrofolát, 5-metil-THF: 5-metil-tetrahidrofolát, 10-formil-THF: 10-formil-tetrahidrofolát, DHF: dihidrofolát, DHFR: dihidrofolát-reduktáz, DMG: dimetilglicin, dTMP: deoxythymidine monophosphate; dezoxi-timidin-monofoszfát, dUMP: deoxyuridine monophosphate; dezoxi-uridin-monofoszfát, metil-R: metildonor molekula, MS: metionin-szintáz, MTHFR: 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, R: akceptor molekula, SAH: S-adenozil-homocisztein, SAM: S-adenozil-metionin, THF: tetrahidrofolát, TS: timidilát-szintáz.

2.4.2. A folátok

2.4.2.1. A folátok szerkezete és metabolizmusa

A B9-vitamin köznapi neve, a folát, egy gyűjtőfogalom, ami magában foglalja a természetes és a mesterséges folátformákat [112]. A természetes folátokat leveles zöldségek, hüvelyesek, citrusfélék, gabonafélék, olajos magvak, valamint állati eredetű termékek (pl. tojássárgája, máj) fogyasztásával vihetjük be a szervezetünkbe. Ezzel szemben a szintetikus folátot, azaz a folsavat, stabil molekulaszervezetéből kifolyólag táplálékkiegészítőként használhatjuk [113]. Mindkét típusú folátmolekula pteridingyűrűből, para-amino-benzoészavból és glutaminsavból épül fel [114]. A természetes folátok pteridingyűrűje redukáltabb a folsavnál, ami oxidálódásra hajlamos, ezáltal hőkezelésre és tárolásra érzékenyebbé teszi [35,115]. További különbség még, hogy a folsav egy glutamáttal rendelkezik, míg a természetes folát poliglutamát láncsal. A poliglutamát láncot a vékonybélből történő felszívódás céljából enzimatikusan le kell hasítani, ami 50%-kal csökkenti a természetes folátok biológiai hasznosulását [116]. A bélhámsejtek végül mindkét formát 5-metil-THF-fé alakítják. Ez a metabolit az egyetlen, ami fiziológiai körülmények között megtalálható a vérplazmában, ezáltal alkalmas a szövetekhez történő szállításhoz és felhasználáshoz, tehát nem csak a DNS-metiláció szempontjából bír kiemelt jelentőséggel [17,115].

A sejtekben a folát poliglutamát formában tárolódik és használódik fel az 1C ciklus során. Tárolásban a főszerepet a máj játssza, ami a szervezet folátkészletének megközelítőleg felével rendelkezik (6-14 mg) [114]. Ezen raktárak azonban gyorsan kiürülhetnek, amennyiben malnutrició, vagy malabszorpciós állapotok, alkoholizmus, felgyorsult sejtosztódás vagy a vitamin metabolizmusában szerepet játszó enzimeket (MTHFR, DHFR, MS, TS) érintő polimorfizmusok állnak fenn [117,118]. Az MTHFR enzim az 1C metabolizmus kulcsa, hiszen hatással van a nukleotidszintézishez szükséges 5,10-metilén-THF, és a metilációban szerepet játszó 5-metil-THF közötti egyensúlyra [38]. Az enzimet kódoló *MTHFR* gén két legismertebb polimorfizmusa, a C677T és az A1298C, meglehetősen gyakoriak [119]. Czeizel Endre és munkatársai által készített 2001-es tanulmány szerint a 677. pozíciót érintő heterozigotáság (C/T) a magyar populáció csaknem felében megfigyelhető [120]. Ez az állapot 20-30%-kal, míg a homozigotáság (T/T) 50-60%-kal csökkenti az enzim működését [26]. Az 1298. pozícióban elhelyezkedő

adenin citozinra történő cseréjéről heterozigótaság (A/C) esetén kevés irodalommal rendelkezünk, azonban a homozigóta állapotról (C/C) ismert, hogy 40%-os csökkenést eredményez az enzim aktivitásában. Azok a személyek, akik mindkét említett variánsra (C677T és A1298C) heterozigóták, szintén 40-50%-kal alacsonyabb enzimfunkcióval bírnak, mint az *MTHFR* mutációval nem rendelkező egyének [121]. Kimutatták, hogy C677T-homozigótaság fennállása esetén alacsonyabb a genomiális DNS-metiláció szintje, és ennek következményeként nagyobb a vastagbélrák kialakulásának kockázata a vad típushoz képest, amennyiben az egyén nem fogyaszt elegendő mennyiségű folátot [38,122]. Tehát ismert *MTHFR* polimorfizmus esetén az 5-metil-THF-, vagy a nagy mennyiségű folsavpótlás képes áthidalni az enzim csökkent konverziós kapacitásából eredő problémákat [119].

2.4.2.2. A folátok hiánya és pótlása

Mivel a folátok jelentős szerepet játszanak az aminosavak és a nukleotidok képződésében, valamint a metilációs folyamatokban, nélkülözhetetlenek a megfelelő sejtosztódáshoz, növekedéshez és fejlődéshez [35]. Ha nincs elegendő metildonor a metionin szintéziséhez, felhalmozódik a homocisztein, ami amellet, hogy a DNS-metiláció gátlásához vezet, oxidatív stresszt és apoptózist is eredményezhet [114,115,123]. Alacsony folátellátottság esetén számos betegség kialakulhat, amelyek közvetlenül a folát hiányával, vagy a hozzá kötődő metabolikus eltérésekkel (pl. magas homociszteinszint) kapcsolatosak [33]. Ilyen kórállapotok többek között a különböző daganatok, a megaloblasztos anémia, a kardiovaszkuláris megbetegedések, a depresszió, a várandóssággal összefüggő komplikációk (pl. placentaleválás, spontán vetélés, koraszülés) és a fejlődési anomáliák (pl. velőcsőzáródási rendellenességek) [47,124-128].

Elsősorban a velőcsőzáródási rendellenességek megelőzésével kapcsolatban merült fel a folsavpótlás nemzetközi szintű megoldásának igénye. Ennek az orvostörténeti eseménynek magyar vonatkozása is van, ugyanis 1992-ben Czeizel Endre és Dudás István fogalmazták meg először a terhesség ideje alatt történő B₉-vitamin fogyasztás fontosságát [129]. Ebben az időben az európai lakosság átlagosan 250 µg folsavat fogyasztott, ami lényegesen kevesebb volt, mint a velőcsőzáródási rendellenességek megelőzéséhez szükséges 400 µg-os mennyiség [39,130,131]. Elsőként az Amerikai Egyesült Államokban és Kanadában kezdték meg a lakosság szabályozott keretek között zajló

pótlását 1998-ban a kukorica- és búzaliszt folsavval történő dúsítása által. Ehhez a kezdeményezéshez később több mint 60 ország, köztük Magyarország is csatlakozott [132]. Hazánkban liszt helyett az élesztőhöz adták a folsavat, hogy pontosabban követhető legyen a dúsításhoz használt vitamin mennyisége. Emellett a pótlásban való részvétel önkényes volt, ugyanis a vásárlók a folsavval dúsított vagy nem dúsított pékáruk közül egyaránt választhattak [35,131,133]. Az Egyesült Államokban kimutatták, hogy az intézkedést követően nem csak a velőcsőzáródási rendellenességek incidenciája csökkent számottevő mértékben (1000 eset/év), hanem a sztrókhoz (31.000 eset/év) és szívinfarktushoz (17.000 eset/év) társult halálesetek száma is [134]. A táplálkozás által történő megfelelő folsavbevitel jól mérhető globális remetilációt idézett elő a fehérvérsejtekben és a vastagbélhámshártyában egyaránt [135,136]. Meggyőző számadatok bizonyították, hogy a folsavpótlás visszaszorította a CRC előfordulását is, ennek ellenére a vitamin vastagbélrák progresszióban betöltött feltételezett szerepétől való aggodalom miatt az intézkedés nem terjedt el Európában [35,137].

2.4.2.3. A folátok kapcsolata a karcinogenezissel

A folátok részt vesznek a DNS-szintézisben és a DNS-metilációban, így egyszerre fejtenek ki genomiális és epigenomiális szabályzó szerepet [138]. Ez a kettős funkció a karcinogenezis szempontjából rendkívül érdekes módon nyilvánul meg, amelyet mindenképpen szükséges figyelembe vennünk az egészség megőrzése vagy visszaállítása érdekében [35,139].

Elégtelen folsavbevitel esetén nem képződik megfelelő mennyiségű 10-formil-THF a purinvázis nukleotidok szintéziséhez. Emellett 5,10-metilén-THF hiányában az uracil előalakja (dUMP) is felszaporodik a timidin prekursor molekulájának (dTMP) ellenében, ami az uracil DNS-be történő hibás beépüléséhez vezet [38,107-109]. Ezen nukleotidszintézis-zavarok mind hozzájárulnak a pontmutációk, valamint a kromoszómátörések kialakulásához [118]. Folsavhiány hatására epigenetikai szinten globális hipometilációt, és ebből következően genomiális instabilitást figyelhetünk meg, amely szintén daganatokhoz vezethet [13]. A vitamin pótlása tehát jótékonynak bizonyul a vastagbélrákok megelőzése szempontjából [138]. Ezt olyan epidemiológiai adatok is alátámasztják, amelyek megfelelő folsavellátottság esetén 20-40%-kal alacsonyabb kolorektális adenóma vagy karcinóma kialakulási kockázatot írnak le a folsavhiányos

egyénekhez képest [140].

A vitamin adása azonban támogathatja a tumorprogressziót azoknál a személyeknél, akiknél fennáll valamilyen rákelőző állapot [13,138]. Ennek háttérében a tumorszuppresszor gének elcsendesítése mellett a daganatos sejtek aktívan működő 1C metabolizmusa állhat, amely a folsavbevitelt követően fokozott nukleotidszintézishez, és ezáltal felgyorsult sejtproliferációhoz vezet [35,108,141]. Ebből kifolyólag a folsavhiányos állapot kifejezetten előnyös a daganatos megbetegedésekben, hiszen a tumorszuppresszor gének promóterében kialakuló hipometiláció, valamint a zavart DNS-szintézis a tumor növekedési ütemének lassulását eredményezheti [35].

Nem csak a folsavpótlás időzítése, hanem az alkalmazott mennyiség is egy sarkalatos tényező a karcinogenezis szempontjából [142]. A vitamin mérsékelt mennyiségben történő fogyasztása jótékony a bélrendszeri daganatok prevenciója esetén, azonban nagy mennyiségben történő alkalmazása mellett nőhet a vastagbélrák incidenciája. Az említett jelenség egy olyan parabolikus függvényként ábrázolható, amely alacsony és magas folsavbeviteli értékek mellett mutat kiugrást az előfordulási gyakoriságban [132]. A CRC kialakulása szempontjából a folát referenciatartományon belüli szintje is meghatározó a vérplazmában. Azok a személyek, akik a tartomány felső határára eső folátértékkel ($\geq 31,04$ nmol/L) jellemezhetőek, csaknem fele akkora veszélynek vannak kitéve a vastagbélrák kialakulását tekintve, mint az alacsony szinttel ($\leq 12,23$ nmol/L) rendelkezők [143].

Felismerve a folsav nukleotidszintézisben, és ezáltal daganatos progresszióban betöltött szerepét, számos antifolát készítmény (pl. raltrexed, lometrexol, pemetrexed, pralatrexát, trimetrexát) kifejlesztésére került sor [144]. Az első ilyen hatású gyógyszer az aminopterin volt, amely a DHFR enzim gátlása révén sikeresen visszaállította a csontvelő egészséges működését az addig kezelhetetlennek hitt gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában [145]. Az aminopterint később felváltotta a kedvezőbb terápiás indexszel rendelkező metotrexát (MTX), amelyet azóta is számos rosszindulatú daganat (pl. emlő- és hólyagrák, non-Hodgkin-limfóma, oszteosarkóma) kezelésére használnak [144,146,147]. A daganatos sejtek transzportrendszerük károsodása következtében csak nagy koncentrációban beadott gyógyszerek felvételére képesek, így, ha kis mennyiségű folsavanalógot használunk az MTX mellé, megvédhetjük az egészséges sejteket a terápia

okozta következményektől. Ilyen célból használt folsavszármazék a leukovorin, vagy más néven folinsav (5-formil-THF) [27,147].

A folsavmetabolizmust az antifolátok mellett az 5-fluorouracil (5-FU) kemoterápiás szer is befolyásolhatja, amely évtizedek óta kulcsszerepet játszik a CRC gyógyításában [148]. Szerkezete hasonlít az uraciléra, azonban egyik hidrogénatomja helyett fluort tartalmaz. A sejtekben fluorodezoxi-uridin-monofoszfáttá (FdUMP; fluorodeoxyuridine monophosphate) alakulva gátolja a timidilát-szintáz működését 5,10-metilén-THF jelenlétében, aminek következménye a dTMP mennyiségének csökkenése, és ezáltal a DNS-szintézis és -javítás elégtelen működése lesz [149]. A terápia hatékonyságának fokozása érdekében a betegek az 5-FU mellé leukovorint is kapnak, amely metabolizálódva 5,10-metilén-THF-fé alakul át [148,150].

2.4.3. A SAM

2.4.3.1. A SAM szerkezete és metabolizmusa

A SAM minden sejtünk citoplazmájában szintetizálódik [25,26]. Képződésének folyamata egyedülálló az élővilágban, ugyanis amellet, hogy felhasználja a táplálékkal elfogyasztott metionin 50%-át, az ATP (adenosine triphosphate; adenosin-trifoszfát) mindhárom foszfátkötéséből származó energia is szükséges hozzá [25,151-153]. Metabolikus tekintetben tehát előállításra meglehetősen költséges, azonban a befektetett energia egy sajátos molekulaszerkezet kialakulásához vezet. A SAM jellegzetessége ugyanis az S-konfigurációban beillesztett, magas energiájú kénatom, amely számos biokémiai folyamatban biztosítja a molekula transzfer funkcióját [25,26,151-155].

A SAM az ATP-t követően a legtöbb reakcióban használt kofaktor molekulánk [25,151]. Olyan összetett a kapcsolatrendszere, hogy akár a biokémiai háló pókjának is nevezhetnénk [156]. Az egy nap alatt keletkezett 6-8 g SAM-mennyiség raktározása javarészt a májban történik, és főként transzmetilációs reakciókra használdik fel. Ennek során a metilcsoport különböző molekulákra (DNS, RNS, hormonok, foszfolipidek és neurotranszmitterek) tevődik át, miközben a SAM SAH-há alakul [25,26]. Az akceptorok széles skálája vezet a metilációs folyamatok sokféleségéhez [25]. Míg a DNS metilációja a génexpresszió szabályozásában játszik szerepet, a neurotranszmitterek metilációja a hangulatot, a foszfolipidek ilyen formájú érintettsége pedig a membrán fluiditását, a

receptorok mobilitását és a sejtek enzimatis aktivitását befolyásolhatja [25,151,157]. A SAM főként úgy ismert, mint a szervezet univerzális metildonor molekulája, azonban más kémiai csoportok forrásaként a transzszulfurációs és aminopropilációs reakciókban is részt vesz [25,151]. Az előbbi folyamat többek között az antioxidáns tulajdonságú glutation, míg az utóbbi a sejtek osztódásához elengedhetetlen poliaminok szintéziséhez vezet [25]. A SAM-ról emellett bebizonyosodott, hogy a B₁₂-vitaminhoz hasonlóan meghatározó szerepet játszik a szabadgyökök szállításában, és ezáltal számos enzimatis reakció megvalósulásában is [152].

Bár a fentebb ismertetett felsorolás nem teljes, de talán rávilágít arra, hogy a SAM által mediált folyamatok száma jelentős. Ebből kifolyólag a molekula jelenléte esszenciális a megfelelő sejtműködéshez, növekedéshez és differenciálódáshoz [25].

2.4.3.2. A SAM hiánya és pótlása

A SAM mennyiségét főként felhasználódásának mértéke, a szervezet metionin ellátottsága és a MAT enzim izotípusa határozza meg [25,152]. Ez utóbbival kapcsolatban kimutatták, hogy magasabb SAM-szinttel rendelkeznek azok a sejtek, amelyek a MAT2B izotípus helyett a MAT1A-t fejezik ki nagyobb mértékben [25].

A SAM-szint csökkenése súlyos következményekkel, pl. neurológiai zavarokkal és májgyulladással jár együtt [25]. A SAM egy FDA (The United States Food and Drug Administration; Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszer-engedélyeztetési Hivatala) által elfogadott táplálékkiegészítő, amelynek mind orális, mind parenterális alkalmazása jól tolerálható és kevés mellékhatással jár. Ebből kifolyólag depresszió, Alzheimer-kór, valamint intrahepatikus epepangás és toxikus anyagok (pl. alkohol, paracetamol, szteroid) által okozott májkárosodás gyógyítására is kiválóan használható [25,158,159]. Kimutatták, hogy oszteoartritisz fennállása esetén olyan hatékonyan képes visszaállítani az ízületek mozgását és csökkenteni a fájdalmat, mint a nem szteroid gyulladásgátlók [160].

2.4.3.3. A SAM kapcsolata a karcinogenezissel

Mivel a SAM DNS-metiláló ágens, potenciálisan képes elcsendesíteni a tumorsuppresszor géneket, ezáltal elősegítve a daganatok kialakulását, vagy egy már

fennálló malignitás progresszióját. Így felmerül a kérdés, hogy nem okoz-e több káros hatást, mint amennyi előny származik a használatából [158,161]. Számos *in vitro* és *in vivo* kísérletet végeztek a SAM-mal kapcsolatban, amelyek mind arról számoltak be, hogy a molekula alkalmas a különböző daganatos betegségek (emlőrák, prosztatarák, gyomorrák, vastagbélrák, oszteoszarkóma, májdaganat) megfékezésében [158,162-164].

Bár a háttérben álló molekuláris mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak, az azonban megállapítható, hogy a SAM képes szelektíven hatni azokra az útvonalakra, amelyek a daganatos sejtekben eltérnek az egészségeshez képest [158,161]. Tehát míg hipometiláció által aktiválja a tumorsuppresszor géneket, remetilációval a protoonkogének elcsendesítéséhez vezet. Emellett gátolhatja a tumorprogresszióval járó aktív demetilációs folyamatokat és elősegítheti a globális hipermetilációt, amelyek a genom stabilizálása szempontjából lényegesek [158,162-165]. Ha SAM-kezelést követően megfigyeljük az összes metilációs változást a genomban, azt tapasztalhatjuk, hogy a hiper- és hipometiláció folyamatai egyensúlyban vannak [161]. Ez azt igazolja, hogy a SAM nem tisztán hipermetiláló molekula, hanem egy metilom modulátor, ami képes epigenetikailag újraprogramozni a daganatos sejteket [158,161]. További SAM-hoz köthető tumorsuppresszív hatás az uPA (urokináz típusú plazminogén aktivátor) gén hipermetilációja is. Az uPA részt vesz a daganatok progressziójában, a metasztázisképzésben és az angiogenezisben, tehát elcsendesítése állhat a háttérben annak, hogy SAM hatására megáll a sejtciklus, valamint csökken az áttétek és az új erek száma [158,162-165]. Ezek a hatások feltehetőleg csak a rövid távú kezelés sajátjai, ugyanis hosszú távon a SAM, bár fokozza a DNS-metilációt, azonban nincs hatással a daganat növekedésére [165].

3. CÉLKITŰZÉSEK

A CRC kialakulásával szorosan együtt jár a globális DNS-metiláció szintjének csökkenése és a tumorsuppresszor gének promóter szakaszait érintő hipermetiláció. Metildonor molekulák alkalmazásával ezen változások potenciálisan visszafordíthatóak. Így doktori munkám során célul tűztem ki a folsav és SAM DNS-metilációra, és ezáltal tumorprogresszióra kifejtett hatásának vizsgálatát HT-29 és SW480 humán vastagbélrák sejtvonalakban. Az irodalmi adatok alapján a kezelőszerek a DNS-metilációban betöltött szerepük mellett más metabolikus útvonalakban is részt vesznek. Az általunk alkalmazott modern molekuláris biológiai módszerek lehetővé tették, hogy kutatásomat kiterjeszthessem ezeknek a folyamatoknak az átfogó tanulmányozására is.

Céljaim a következők voltak:

1. A CRC sejtekre jellemző aberráns metilációs mintázat folsav- és SAM-adást követő reverzibilitásának (globális remetiláció, promóter demetiláció) vizsgálata;
2. A folsav- és SAM-kezelés CRC sejtvonalak proliferációjára, viabilitására, továbbá a sejtciklus változásaira gyakorolt hatásának megfigyelése;
3. A CRC sejtvonalak genomális stabilitásában bekövetkező változások tanulmányozása folsav- és SAM-adás hatására;
4. Genomszintű génexpressziós analízis elvégzése folsav- és SAM-kezelést követően, amely magában foglalja az útvonalelemzést is;
5. A promóter szakaszt érintő DNS-metiláció és az adott gén kifejeződésében mérhető változás közötti kapcsolat feltárása;
6. A kísérletek során használt HT-29 és SW480 sejtvonalak mutációs profiljának felállítása, valamint ezen genetikai eltérések összevetése az eddigi vizsgálataink által kapott eredményekkel.

4. MÓDSZEREK

4.1. Sejttenyésztés és -kezelés

4.1.1. A sejtek fenntartása

Vizsgálatainkban két humán vastagbélrák sejtvonalat használtunk: a HT-29-et (HTB-39) és az SW480-at (CCL-228), amelyeket az ATCC (American Type Culture Collection; Amerikai Sejtkultúra Gyűjtemény) sejtbankból szereztünk be. Azért választottunk CIN+ sejteket, mert a vastagbélrákok jelentős százaléka ezen a molekuláris útvonalon alakul ki [68]. Ugyanakkor törekedtünk arra, hogy a sejtvonalak között fennálljanak lényeges genetikai és epigenetikai különbségek, hogy a metildonor molekulák hatását ilyen szempontból is megfigyelhessük. Így CIN-pozitivitása mellett a HT-29-ről többek között elmondható még, hogy egy CMS3 és CIMP+ sejtvonala, míg az SW480 sejtek a CMS4 és a CIMP- kategóriába sorolhatók.

A sejtvonalatokat 37 °C-on 5%-os CO₂ koncentráció mellett RPMI 1640 tápfolyadékban (LM-R1641, Biosera) tartottuk, amely 10% főtális borjúsavót (Biosera), 80 mg/2 mL gentamicint (Sandoz GmbH) és 2 mM L-glutamint (Biosera) tartalmazott. A passzálást a HT-29 sejtvonala esetében heti két alkalommal, az SW480-nál viszont nagy proliferációs rátájából adódóan heti háromszor végeztük el. A sejtek fenntartásához T25-ös tenyésztőflaskát (Sarstedt), a kezelésekhez pedig kísérleti típustól függően 6-, vagy 96-lyukú plate-et (Sarstedt) használtunk. Az előbbihez 1,25x10⁵ sejtre volt szükségünk 2,5 ml tápfolyadékban, az utóbbi esetében viszont csupán 3x10³ sejtet tettünk 100 µL médiumba well-enként. A kezelés megkezdése előtt a plate-en 24 órán keresztül inkubáltattuk a sejteket a megfelelő letapadás érdekében.

4.1.2. A sejtek kezelése

4.1.2.1. A sejtek kezelése folsavval

A kezelést megelőzően a sejteket 1x-es PBS-sel (phosphate-buffered saline; foszfát-pufferes sóoldat) mostuk, és a tenyésztő médiumot folsavmentes RPMI 1640-re (LM-R1642, Biosera) cseréltük ki. A folsavat (Sigma-Aldrich) 100 és 10.000 ng/mL koncentrációban adtuk a sejteknek. Míg az előbbi a megfelelő folsavellátottság [166], az

utóbbi az extrém mértékű folsavbevitel modellezésére alkalmas. A szilárd halmazállapotú folsavat a gyártói utasításoknak megfelelően 1 M-os NaOH-ban oldva adtuk a sejtek médiumához. Ezzel párhuzamosan olyan kontroll mintákat is létrehoztunk, amelyekben a sejteket ugyanolyan mennyiségű NaOH-val kezeltük, mint amennyiben a kezelések esetében a folsavat feloldottuk. Az értékelések során a kontrollok eredményeit kivontuk a folsavval kezelt minták eredményeiből, hogy követhessük a folsav egyéni hatását a sejteken. Az összes kezelési feltétel esetében három párhuzamos mintát használtunk. A 72 órás inkubációt követően a sejteket TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) segítségével távolítottuk el a plate-ről, majd a mikroszkópos sejtszámolás alkalmával tripánkék festéssel kvantifikáltuk az élő sejtek számát.

4.1.2.2. A sejtek kezelése SAM-mal

A SAM-kezelések protokollja lényegében megegyezett a folsav esetében leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy 72 óra helyett 48 órán keresztül alkalmaztuk a kezelőszert. A sejteket a tenyésztés ideje alatt az eredeti tápfolyadékukban, tehát folsavas RPMI 1640-ben tartottuk. Annak köszönhetően, hogy a folyékony halmazállapotú SAM (New England BioLabs) jól oldódott a médiumban, nem volt szükségünk kontrollok használatára. Irodalmi adatok és saját citotoxicitási eredményeink alapján 0,5 és 1 mmol/L SAM-koncentrációt alkalmaztunk a kezelések során [162,167,168].

4.2. A sejtvonalak sejtbiológiai alapfolyamataira vonatkozó molekuláris vizsgálatok folsav- és SAM-kezelést követően

4.2.1. A sejtek életképességének és proliferációjának vizsgálata alamarBlue és szulforodamin B módszerekkel

A sejtek életképességét, avagy viabilitását az elektrontranszportlánc aktivitásának vizsgálatán alapuló alamarBlue módszerrel figyeltük meg. A sejtek osztódási ütemét, azaz proliferációját pedig szulforodamin B (SRB) teszttel vizsgáltuk, ami a sejttömegről adott tájékoztatást.

Az alamarBlue-t (Thermo Fisher Scientific) az inkubációs idő lejártát megelőzően 4 órával adtuk a 96-lyukú plate-ben található sejtekhez. Majd 4 órával később a viabilitás kimutatása céljából 570-590 nm tartományban fluoriméter (Fluoroskan Ascent FL,

Labsystems International) használatával megmértük a fluoreszcenciát.

A vizsgálatot követően SRB analízist végeztünk ugyanazon a sejtenyésztő lemezen, hogy képet kaphassunk a sejtek osztódásának üteméről a különböző kezelési feltételek mellett. Első lépésként a sejteket 10%-os triklór-ecetsavval fixáltuk egy órán keresztül 4 °C-on, majd csapvízzel történő átmosást követően 50 µL 0,4 m/V%-os SRB használatával festettük őket 15 percen keresztül szobahőmérsékleten. A nem kötődő festéket 1 V/V% triklór-ecetsavval távolítottuk el és végül a levegőn megszárított mintákat 150 µL 10 mM Tris bázissal kezeltük, hogy kioldjuk a sejtekhez kötődő festéket. Alapos rázatást követően az abszorbanciát 570 nm-en mértük meg mikroplate leolvasó (Multiskan MCC 355, Labsystems International) segítségével és a Transmit szoftver használatával (Labsystems International). A sejtvitalitás és sejtproliferáció arányát azokhoz a mintákhoz viszonyítottuk, amelyeket az eredeti tenyésztőmédiumban (folsavas RPMI 1640) tartottuk.

4.2.2. A sejtciklus vizsgálata áramlási citometriával

Megközelítőleg 1×10^6 HT-29 és SW480 sejtet használtunk a FACS (fluorescence-activated cell sorting; fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás) vizsgálathoz. A mintákat 1x-es PBS-mosást követően 70%-os etanollal fixáltuk -20 °C-on. Másnap lecentrifugáltuk a sejteket (5 perc, 1400-as fordulatszám) és az üledéket 1x-es PBS-sel szuszpendáltuk fel. RNáz- (Thermo Fisher Scientific) kezelést (2,5 µL) végeztünk 15 percen keresztül, majd 2 µL 2mg/mL propidium-jodidot (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez. Az áramlási citometriás mérést FACSCalibur készüléken (Becton, Dickinson and Company) hajtottuk végre és CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company) programot használtunk az adatok kiértékeléséhez.

4.2.3. Genomiális instabilitás vizsgálata mikronukleusz-számolással

A genomiális instabilitás mértékének meghatározása céljából mikronukleusz-számolást végeztünk. A folsav és SAM tápfolyadékhoz történő adását megelőzően fedőlemezt helyeztünk a 6-lyukú plate-ekbe, és erre növesztettük rá a sejteket a Valcz és munkatársai által kidolgozott protokoll szerint [169]. A kezelés után mostuk, majd 10 percen keresztül fixáltuk a mintákat 10%-os formalinnal 4 °C-on. Ezt követően 0,2%-os Triton X-100

használatával újabb 10 percen keresztül permeabilizálást végeztünk szobahőmérsékleten. Anti- γ -H2AX antitestet (Abcam, anti-egér) használtunk a mikronukleuszok γ -H2AX pozitivitásának vizsgálatára (1 óra, 1:150 hígítás, szobahőmérséklet), amit Alexa 488 antitesttel (Invitrogen) jelöltünk (30 perc, 1:200 hígítás, szobahőmérséklet). A sejtmagokat és a mikronukleuszokat DAPI-val (4,6-diamidino-2-phenylindole; 4,6-diamidino-2-fenilindol, Thermo Fisher Scientific) festettük (5 perc, 1:1000 hígítás, szobahőmérséklet). Az immunfestés minden lépése után háromszor mostuk a mintákat 1x-es PBS-el. Ezt követően a tárgylemezeket Panoramic Confocal szkennelrel (3DHISTECH Ltd.) digitálisan archiváltuk, úgy, hogy mintánként 21 darab felvételt vettünk fel 0,4 μ m fókusz távolságonként a Z tengelyen. A vizsgált terület több mint 1000 sejtet tartalmazott. A mikronukleusz-számolást és a mikronukleuszok γ -H2AX-pozitivitásának arányát a CaseViewer szoftver CellQuant alkalmazásával (3DHISTECH Ltd.) kvantifikáltuk.

4.2.4. Genomiális instabilitás vizsgálata comet próbával

A DNS-kettőstörés jelenlétének kimutatására comet próbát használtunk. Ehhez a letapadt sejteket először egy műanyag kaparó eszközzel távolítottuk el a lemezekről, majd a mintákat Dulbecco PBS-sel (Sigma-Aldrich) mostuk. A kísérlet során a Comet Assay Kit-et (Abcam) a gyártói utasításoknak megfelelően használtuk egy apró módosítással: a gyártó által biztosított lemezeket 1%-os normál olvadáspontú agarózzal bevont Superfrost Ultra Plus lemezekkel (Thermo Fisher Scientific) helyettesítettük. Az egysejtes gélelektroforézist alkalikus oldatban végeztük 150 mA-n 45 percen keresztül, majd a DNS-t Vista Green festékkel (Abcam) festettük. A gélelektroforézis során képződött üstökös (ún. comet) alakú DNS-fragmenseket fluoreszcens mikroszkóphoz (Carl Zeiss) kapcsolt AxioCam kamerával (Carl Zeiss) rögzítettük. Mintánként legalább 50 sejtet vizsgáltunk a Comet Score szoftver használatával, és végül a DNS csóva részét arányosítottuk egy sejt DNS-tartalmához, hogy megkapjuk az úgynevezett csóva-DNS százalékot, ami megadja a DNS-törések mennyiségét.

4.2.5. Statisztikai számítások

A szignifikancia ($p \leq 0,05$) megállapításához először Shapiro-Wilk-normalitásvizsgálatot végeztünk. Amennyiben egy adott kísérleten belül nem állt fenn normalitás bármely

sejtvonal vagy kezelőszerszám esetében, úgy Kruskal-Wallis tesztet hajtottunk végre Dunn-féle többszörös összehasonlítással kiegészítve. Normál eloszlás esetén egyszempontos ANOVA-val (analysis of variance; varianciaanalízis) és Tukey-féle post-hoc teszttel számoltuk ki a szignifikanciaértéket. Az áramlási citometriás vizsgálatoknál, a többi kísérlettől eltérően, kétszempontos varianciaanalízist használtunk. A statisztikai elemzéseket minden esetben a Prism 8.0.2 (GraphPad) szoftver segítségével végeztük el.

4.3. A sejtvonalak epigenomikai, genomikai és transzkriptomikai változásaira vonatkozó genomszintű vizsgálatok folsav- és SAM-kezelést követően

4.3.1. Globális DNS-metiláció meghatározása LINE-1 piroszekvenálással

A sejtekből a kezelést követően High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével DNS-t izoláltunk. A mintákból kinyert DNS mennyiségének megállapításához Qubit 1.0 fluorimétert alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific) Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) használatával. Mintánként 100 ng mennyiségű DNS-ből biszulfítkonverziót végeztünk az EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research) által. A LINE-1 promóter régiókban elhelyezkedő 146 bázispár hosszúságú szakaszt PyroMark PCR Kit-tel (Qiagen) felsokszorozítottuk, és a keletkezett PCR (polymerase chain reaction; polimeráz-láncreakció) -termék hosszúságát gélelektroforézissel ellenőriztük. A PyroMark Q24 CpG LINE-1 kézikönyv (Qiagen) utasításainak megfelelően hajtottuk végre a minták piroszekvenálásra történő előkészítését a PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen) használatával. A szekvenálást a PyroMark Q24 System (Qiagen) segítségével végeztük el, és a kapott DNS-metilációs értékeket a PyroMark Q24 Software (Qiagen) által számoltuk ki. Az adott minta globális DNS-metilációs értékét a módszer által detektált három LINE-1 CpG-pozíció metilációjának átlaga adta meg.

4.3.2. Genomszintű DNS-metiláció meghatározása Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) módszerrel

Az RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing; csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás) módszer által történő DNS-metiláció meghatározáshoz olyan sejteket vizsgáltunk, amelyeket folsavmentes vagy 10.000 ng/mL folsavat tartalmazó

médiumban tartottunk, valamint 0 vagy 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezeltünk. A LINE-1 piroszekvenáláshoz hasonlóan először a fent ismertetett protokoll szerint DNS-t izoláltunk a sejtekből. Majd a minták feldolgozásához Premium Reduced Representation Bisulfite Sequencing Kit-et (Diagenode Diagnostics) használtuk, és a lépéseket a gyártói utasítások szerint hajtottuk végre. Ezt követően qPCR-rel (quantitative polymerase chain reaction; kvantitatív polimeráz-láncreakció) végeztük el a mennyiségi meghatározást. A biszulfitkonverzió és amplifikáció után a DNS mennyiségét Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) használatával Qubit 1.0 fluoriméter készüléken mértük meg. A minőségi elemzést Bioanalyzer 2100 mikropilláris elektroforézis készüléken (Agilent Technologies) hajtottuk végre High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies) használatával. A kész könyvtárakat a Next Seq System Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina) útmutatásai alapján a NextSeq 500/550 High Output Sequencing Kit v2 (75 cycles) (Illumina) használatával készítettük elő. Végül a szekvenálás egy NextSeq 500 (Illumina) szekvenátorral valósult meg.

A szekvenálás által kapott nyers FASTQ file-okon a fastQC program segítségével minőségi elemzést hajtottunk végre. Az adapterek levágása és az alacsonyabb minőségű szekvenciák kiszűrése a Trim Galore (Babraham Bioinformatics) programmal történt. A hg38 referenciagenomot az illesztést megelőzően *in silico* biszulfitkonvertáltuk és indexáltuk a Bismark szoftver használatával. Majd szintén ezzel a programmal végeztük el az illesztést és a metilációs százalék meghatározását az alapértelmezett beállításokat alkalmazva. A kezelés hatására megváltozott metilációs értéket adó helyeket (DMS; differentially methylated site) páros összehasonlítások során a methylKit R csomaggal határoztuk meg, majd a “SLIM” módszerrel korrigáltuk. A lehetséges DMS-ek közül kiszűrtük azokat, amelyek metilációs különbsége a két minta összehasonlításakor 15% alatt volt, vagy a q értéke meghaladta a 0,05-öt. A DMS-ek annotációját az UCSC Genome Browser weboldaltól letöltött adatbázisok segítségével végeztük el.

A metilációváltozás által érintett gének számát Venn-diagramon ábrázoltuk, illetve a DMS-ek eloszlását a genomban kördiagramon mutattuk be. Végül KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kiotói Gén és Genom Enciklopédia) útvonalelemzést hajtottunk végre a DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Adatbázis Annotáláshoz, Ábrázoláshoz és Integrált Kutatáshoz)

v6.8 program használatával Nagy és munkatársai alapján [170]. Hőtésképen jelenítettük meg azt a 10 útvonalat, amelyek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) a legtöbb DMS-sel rendelkeztek.

4.3.3. Genomszintű DNS-metiláció meghatározása bead array módszerrel

A mikroarray technikán alapuló DNS-metilációs vizsgálatot SAM-mal végzett kísérleteink során hajtottuk végre minden kezelési kondíció esetén. Az előbbi két metilációs analízishez hasonlóan végeztük el a sejtekből a DNS-izolálást. A kezelt mintákból 250 ng DNS-t használtunk fel a több mint 850.000 metilációs hely tanulmányozásához. Az elemzést a Diagenode Diagnostics vállalat megbízásából a bécsi Austrian Institute of Technology végezte. A minták előkészítése magában foglalta a biszulfítkonverziót, a DNS-sokszorozást és fragmentációt, amit a DNS EPIC BeadChip-hez (Illumina) történő hibridizáltatása követett. A metilált vagy nem metilált gyöngyöket biotin és 2,4-dinitrofenol jelölés után szkenneléssel detektáltuk.

A kapott IDAT formátumú nyers adatokat a ChAMP R csomagjával dolgoztuk fel. Kiszűrtük azokat az alacsony minőségű próbákat, amelyek p értéke 0,01 fölött volt bármely mintában, vagy gyöngyszámuk három alatt volt a minták legalább 5%-ban. Továbbá kizárásra kerültek a nem-CpG, SNP-hez (single nucleotide polymorphism, egyponos nukleotid-polimorfizmus) köthető, nem specifikus, vagy X és Y kromoszómán elhelyezkedő próbák is. Nem vettük figyelembe azokat a próbákat sem, amelyek metilációs szintje a két kezelt mintában a kontrollhoz (0 mmol/L) képest eltérő irányultságot mutatott. A normalizálást a Beta Mixture Quantile módszerrel hajtottuk végre. Végül a követelményeknek megfelelő 721.878 próbát használtuk az elemzéseinkhez, és egy újabb szűréssel ezek közül azokat vettük figyelembe, amelyek a CpG-szigeteken belül helyezkedtek el.

Az átlagos metilációs szinteket (β -értékek) t-tesztekkel hasonlítottuk össze, amit Benjamini-Hochberg korrekció követett. Azokat a próbákat ítéltük szignifikánsan változónak, amelyek esetén a korrigált $p \leq 0,05$ követelmény teljesült. Amennyiben egy próba β -értéke a 0,5 mmol/L-es és az 1 mmol/L-es SAM kezelés esetén is alacsonyabb volt, mint a kontroll mintáé, hipometilációt állapítottunk meg. Ellenkező esetben hipermetilációról beszéltünk. A tíz legnagyobb hipo- vagy hipermetilációs változást ($\Delta\beta$)

mutató CpG-hellyel rendelkező gént hőterképen ábrázoltuk.

4.3.4. Genomszintű génexpressziós változások vizsgálata mikroarray módszerrel

A sejteket a plate-ről való eltávolítást követően 350 µL β-merkaptotanol tartalmú RLT pufferben (Qiagen) fagyasztottuk le -80 °C-ra. A mintákból RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével RNS-t izoláltunk. A kapott koncentrációt az RNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával Qubit 1.0 fluorométerrel mértük meg. Az RNS minőségének meghatározásához Bioanalyzer 2100 készüléket (Agilent Technologies) és RNA 6000 Pico Assay Kit-et (Agilent Technologies) használtunk. A további vizsgálatainkat csak azokkal a mintákkal folytattuk, amelyekből megfelelő minőségű RNS-t tudtunk kinyerni, tehát RIN-értékük (RNA integrity number; RNS-integritásérték) nagyobb volt mint 8. Ezt követően a GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) által a gyártói javaslatok alapján elvégeztük a minták sokszorosítását, mennyiségi meghatározását, fragmentációját és jelölését. Végül megtörtént az előkészített termék HTA 2.0 mikroarray-hez (Human Transcriptome Array 2.0; Humán Transzkriptom Array 2.0, Affymetrix) való hibridizálása. A mosást, festést és szkennelést Kalmár és munkatársai által leírt protokoll szerint végeztük [171].

A nyers adatokat SST-RMA algoritmus használatával normalizáltuk, és a génexpressziós változásokat a TAC 4.0 (Transcriptome Analysis Console 4.0; Transzkriptomelemző Konzol 4.0, Affymetrix) szoftverrel értékeltük ki. A program segítségével kiszámoltuk a szignifikáns ($p \leq 0,05$), és a legalább $\pm 1,5$ expressziós intenzitáskülönbséget (FC; fold change) mutató transzkriptumok számát, valamint a csökkenő és növekvő expressziós változások arányát is. A páros összehasonlításához a folsavas kísérlet esetében a kezeletlen (0 ng/mL) és a 10.000 ng/mL koncentrációval kezelt, a SAM-mal történt kísérletek során pedig a 0 és 1 mmol/L SAM koncentrációval ellátott mintákat alkalmaztuk. Ezt követően az Ensembl Genome Browser BioMart alkalmazásával annotáltuk az említett kritériumoknak megfelelő transzkriptumokat, majd megneveztük a top10 csökkenő és növekvő FC-vel rendelkező gént, amelyeket vulkándiagramon ábrázoltunk. A folsavas kezelés esetében a kritériumoknak ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,5|$) megfelelő génlista alapján fehérje-fehérje-kölcsönhatás vizsgálatokat végeztünk a Cytoscape szoftver használatával, majd színekódolással jelöltük a génexpressziós változások mértékét. Az érintett gének különböző molekuláris útvonalakban történő részvételét a PANTHER 16.0 (Protein

Analysis Through Evolutionary Relationships 16.0; Fehérjeelemzés Evolúciós Kapcsolatokon Keresztül 16.0) segítségével határoztuk meg. Az adatokat pedig a GEO (Gene Expression Omnibus; Génexpressziós Adatbázis) felületre töltöttük fel, amelyek a következő referenciaszámon érhetőek el: GSE186084. A SAM-mal folytatott vizsgálataink során 4 molekuláris útvonal esetében kiválasztottuk azokat a géneket, amelyek a kontroll és 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezelt minták között szignifikáns ($p \leq 0,05$) és legalább $\pm 1,4$ FC értékű változással voltak jellemezhetőek. Hőtérképen ábrázoltuk a három kezelési koncentrációnál tapasztalt expressziós különbségeket. Az adatok a GSE152870 referenciaszám alatt megtalálhatóak a GEO adatbázisban.

Végül összevetettük a DNS-metilációs és génexpressziós elemzések során kapott génlistákat, hogy összefüggéseket keressünk a promótermetiláció és a génátíródás mértéke között. Számszerűsítettük azokat a géneket, amelyek hipermetilált promóter esetén csökkent, hipometilált promóter esetén pedig emelkedett expressziós értékkel rendelkeztek a kezelés után.

4.3.5. A sejtvonalak mutációs profiljának vizsgálata teljesexom-szekvenálással

A DNS-metiláció vizsgálataihoz hasonlóan először DNS-izolálást végeztük, majd Nextera DNA Exome Kit (Illumina) használatával végrehajtottuk a könyvtárkészítést mintánként 50 ng kiindulási DNS-ből. A tagmentáció, az indexálás és a minta sokszorosítása a gyártói utasítások alapján történt. Ezt követően a tisztított könyvtárak mennyiségi analizisét Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el Qubit 1.0 fluoriméteren (Thermo Fisher Scientific). A fragmenshossz-eloszlások meghatározása High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies) használatával Bioanalyzer 2100 mikrokapilláris elektroforézis készüléken (Agilent Technologies) ment végbe. Az amplifikált, kettősszálú DNS-t tartalmazó könyvtáraink szekvenálását NextSeq 500/550 High Output Sequencing Kit (150 cycles) (Illumina) használatával NextSeq 500 készüléken végeztük el.

A szekvenálási adatok minőségi analiziséhez fastQC és multiQC szoftvereket használtunk. Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a szekvenálás minőségi mutatói megfelelőek, a nyers FASTQ file-okat ráillesztettük a hg38 humán referencia genomra a BWA-MEM algoritmussal. A mutációkat a Genome Analysis Tool Kit 4.1.4.1

programcsomag segítségével határoztuk meg. Ezen belül az ismétlődő read-eket a Picard MarkDuplicates, a csírvonal mutációkat a HaplotypeCaller, a GenomicsDBImport, a GenotypeGVCFs, a VariantRecalibrator és az ApplyRecalibration, a szomatikus mutációkat pedig a Mutect2 és FilterMutectCalls programok használatával azonosítottuk. Egészséges személyek teljesexom-szekvenálási adataiból egy “normál minta panel”-t készítettünk a vizsgált mintákhoz hasonlóan. Minden kimutatott mutációt annotáltunk a vcf2maf és Ensembl Variant Effect Predictor szoftverek segítségével. A disszertációban bemutatott teljesexom-szekvenálási adatok megtalálhatóak az SRA-ban (Sequence Read Archive; Szekvenciaolvasó Archívum) a következő azonosítószám alatt: SUB7855933. A vizsgálandó géncsoportokat az OnkoKB, valamint WikiPathways adatbázisok használatával határoztuk meg.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A folsav- és SAM-kezelés hatása a sejtproliferációra, sejtvitalitásra és sejtciklusra

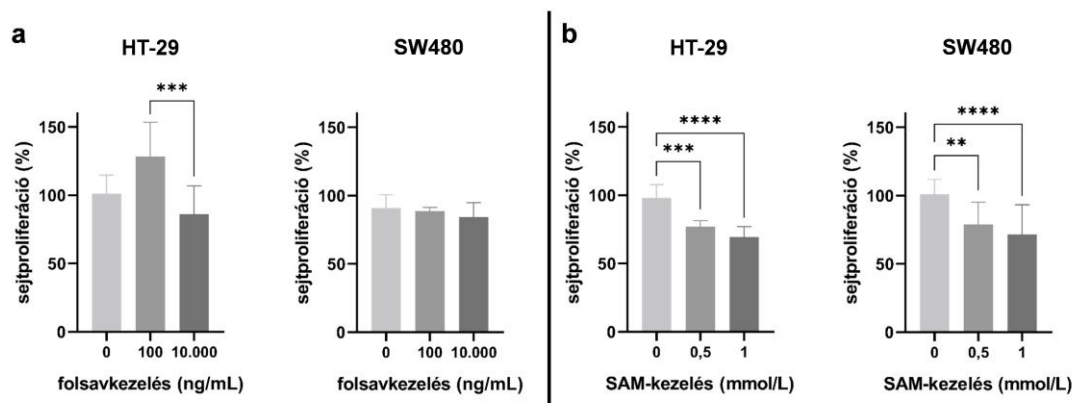
5.1.1. Sejtproliferációs változások

5.1.1.1. Sejtproliferációs változások folsavkezelés hatására

A HT-29 sejtek esetén a legmagasabb sejtproliferációs szintet 100 ng/ml folsavpótlás hatására mértük (HT-29₁₀₀: 128,43 ± 24,94%). Ehhez az értékhez képest a folsavmegvonás (HT-29₀: 101,25 ± 13,53%) és a 10.000 ng/ml folsavkoncentráció (HT-29_{10.000}: 86,06 ± 20,75%) a sejtproliferáció csökkenéséhez vezetett. Az SW480 sejtvonalban ezzel szemben nem figyeltünk meg jelentős változásokat a különböző folsavkoncentrációk esetében (SW480₀: 90,96 ± 9,72%, SW480₁₀₀: 88,75 ± 2,69%, SW480_{10.000}: 84,15 ± 10,67%) (9. ábra/a).

5.1.1.2. Sejtproliferációs változások SAM-kezelés hatására

A SAM-kezelés mindkét sejtvonalban koncentrációarányosan vezetett a proliferáció csökkenéséhez. A változások a kontroll mintákhoz képest szignifikánsak ($p \leq 0,01$) voltak (HT-29₀: 98,08 ± 9,71%, HT-29_{0,5}: 76,93 ± 4,48%, HT-29₁: 69,54 ± 7,63%; SW480₀: 100,98 ± 10,88%, SW480_{0,5}: 79,00 ± 16,11%, SW480₁: 71,54 ± 21,67%) (9. ábra/b).



9. ábra. A HT-29 és SW480 sejtek proliferációjának vizsgálata szulforodamin B (SRB) tesztel folsav- (a) és S-adenozil-metionin- (b) kezelést követően. Az előbbi esetében a sejteket folsavmentes (0 ng/mL), valamint 100 és 10.000 ng/mL folsavtartalmú

médiumban tartottuk 72 órán keresztül, míg az utóbbi kísérletben 0, 0,5 és 1 mmol/L S-adenozil-metionin koncentráció mellett 48 órás inkubációs időt alkalmaztunk. A tenyésztőmédiumban tartott sejtek mediánját vettük 100%-nak, és ehhez viszonyítottuk a kezelést követő proliferációs változásainkat [172,173]. SAM: S-adenozil-metionin (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

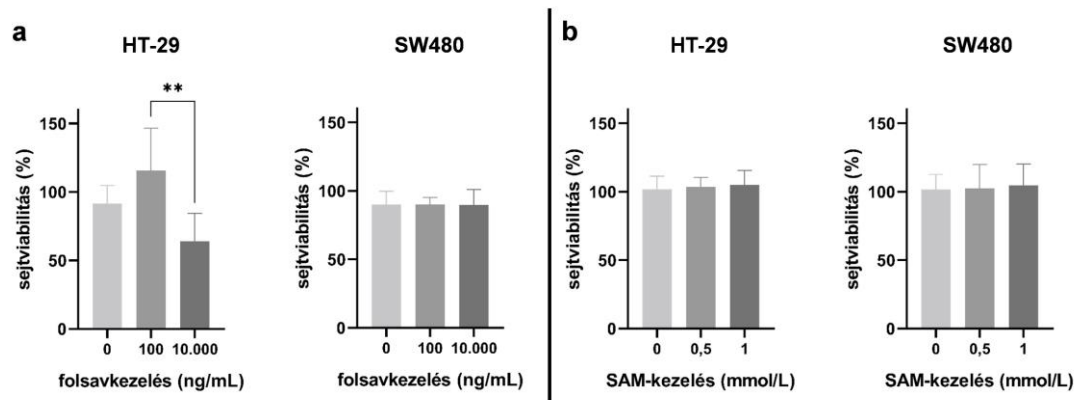
5.1.2. Sejtviabilitás-változások

5.1.2.1. Sejtviabilitás-változások folsavkezelés hatására

A sejtek viabilitása a folsavkezelés hatására a proliferációs elemzések során észlelt eredményekhez hasonlóan változott. A HT-29 sejtekben folsavmentes környezet (HT-29₀: 91,57 ± 13,27%) és szuprafiziológiás kezelés (HT-29_{10.000}: 64,06 ± 20,24%) esetén is alacsonyabb értékeket kaptunk, mint 100 ng/ml FA-mennyiség alkalmazása mellett (HT-29₁₀₀: 115,81 ± 30,88%). Az SW480 sejtekben azonban az életképesség 90% körül volt, függetlenül az alkalmazott folsav dózistól (SW480₀: 90,22 ± 9,55%, SW480₁₀₀: 90,05 ± 5,03%, SW480_{10.000}: 89,72 ± 11,22%) (10. ábra/a).

5.1.2.2. Sejtviabilitás-változások SAM-kezelés hatására

A proliferációs eredményektől eltérően SAM hatására nem tapasztaltunk változásokat a sejtek életképességét tekintve (HT-29₀: 101,92 ± 9,51%, HT-29_{0,5}: 103,71 ± 6,94%, HT-29₁: 105,07 ± 10,51%; SW480₀: 101,80 ± 10,98%, SW480_{0,5}: 102,43 ± 17,54%, SW480₁: 104,76 ± 15,55%). Ha figyelembe vesszük a folsavas kísérlet viabilitási vizsgálatát is, megállapíthatjuk, hogy a folsavmentes tápfolyadékban kb. 10%-kal kevésbé voltak életképesek a HT-29 és SW480 sejtek, mint a SAM-kezelések alkalmával használt folsavtartalmú médiumban (10. ábra/b).



10. ábra. A HT-29 és SW480 sejtek életképességének vizsgálata alamarBlue teszttel folsav- (a) és S-adenozil-metionin- (b) kezelést követően. Az előbbi esetében a sejteket folsavmentes (0 ng/mL), valamint 100 és 10.000 ng/mL folsavtartalmú médiumban tartottuk 72 órán keresztül, míg az utóbbi kísérletben 0, 0,5, és 1 mmol/L S-adenozil-metionin koncentráció mellett 48 órás inkubációs időt alkalmaztunk. A tenyésztőmédiumban tartott sejtek mediánját vettük 100%-nak, és ehhez viszonyítottuk a kezelést követő viabilitási változásainkat [172]. SAM: S-adenozil-metionin (** $p \leq 0,01$).

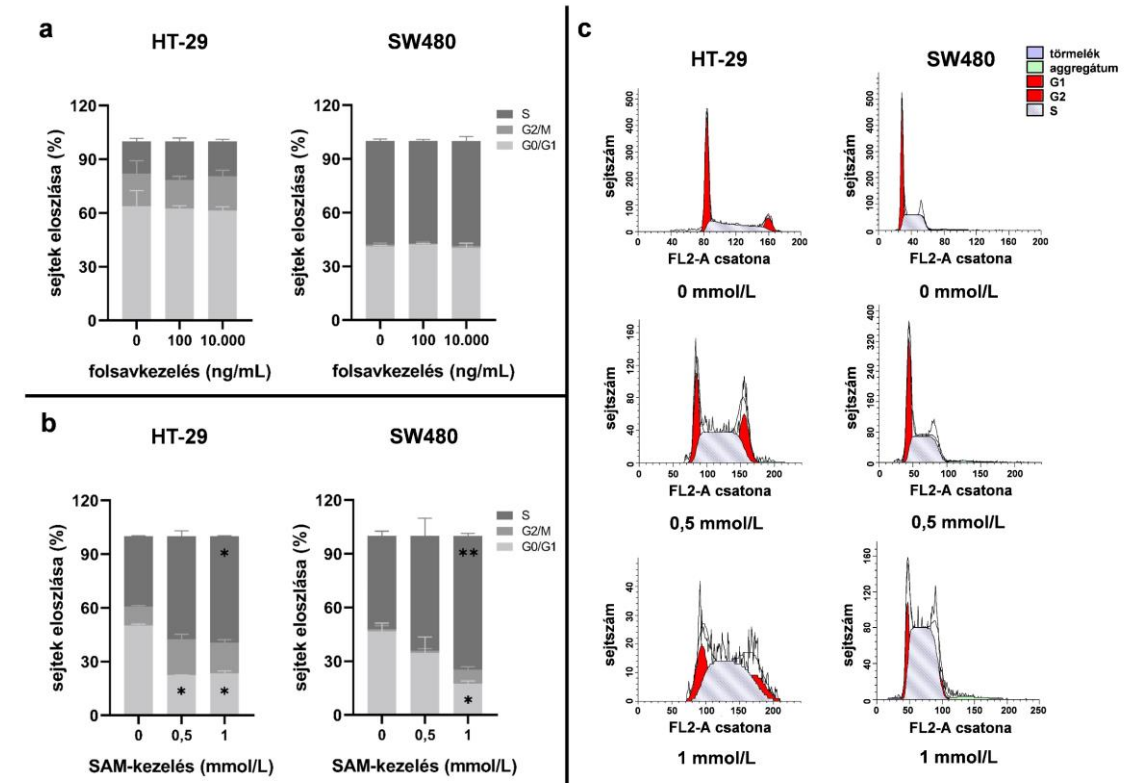
5.1.3. Sejtciklus-változások

5.1.3.1. Sejtciklus-változások folsavkezelés hatására

A sejtek aránya a különböző fázisokban specifikus volt az adott sejtvonalra, így a HT-29 mintákban G0/G1-, az SW480 sejtekben pedig S-fázis dominanciát vettünk észre. Érdekes módon azonban a folsavkezelés nem befolyásolta lényegesen a sejtciklust (az összes HT-29 minta átlaga: $62,51 \pm 4,76\%$ a G0/G1-ben, $17,90 \pm 4,32\%$ a G2/M-ben és $19,59 \pm 2,12\%$ az S-fázisban; az összes SW480 minta átlaga: $41,31 \pm 1,60\%$ a G0/G1-ben, $0,81 \pm 0,66\%$ a G2/M-ben és $57,88 \pm 1,59\%$ az S-fázisban) (11. ábra/a).

5.1.3.2. Sejtciklus-változások SAM-kezelés hatására

A folsavpótlással ellentétben a SAM használata mellett jelentős változásokat figyelhettünk meg a sejtciklus tekintetében. A kezelés hatására mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan ($p \leq 0,05$) csökkent a G0/G1- (HT-29: $50,00 \pm 0,81\%$ -ról $23,31 \pm 1,58\%$ -ra; SW480: $46,71 \pm 4,59\%$ -ról $17,49 \pm 1,49\%$ -ra), valamint nőtt az S- (HT-29: $39,29 \pm 0,28\%$ -ról $59,49 \pm 0,25\%$ -ra; SW480: $52,12 \pm 2,70\%$ -ról $74,68 \pm 1,39\%$ -ra) és



11. ábra. HT-29 és SW480 sejtvonalak áramlási citometriával történő vizsgálata 72 órás folsav- (a) és 48 órás S-adenozil-metionin- (b) kezelést követően. A folsavas kísérlet esetében a sejteket folsavmentes tápfolyadékban (0 ng/mL) tartottuk, vagy 100 és 10.000 ng/mL folsavmennyiséggel láttuk el, míg az S-adenozil-metioninnal folytatott kísérleteink 0, 0,5 és 1 mmol/L koncentráció mellett valósultak meg. Oszlopdiagramok ábrázolják a sejtek különböző fázisokban történő eloszlását a két kezelőszer hatására (a,b), valamint jellegzetes hisztogramok mutatják be a SAM sejtciklusváltozást okozó hatását (c) [172,173]. SAM: S-adenozil-metionin (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5.2. A folsav- és SAM-kezelés hatása a genom stabilitására

5.2.1. Mikronukleuszok számának változása

5.2.1.1. Mikronukleuszok számának változása folsavkezelés hatására

Az immuncitokémiai vizsgálat alapján a HT-29 sejtek $0,56 \pm 0,05\%$ -a rendelkezett

mikronukleusszal a folsavmentes környezetben, míg a kapott érték a kezelés hatására szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent (HT-29₁₀₀: $0,17 \pm 0,05\%$, HT-29_{10.000}: $0,25 \pm 0,09\%$). Ezzel szemben folsavhiány mellett az SW480 sejtek $0,79 \pm 0,10\%$ -ának volt mikronukleusza, és ezt az arányt a kezelés nem változtatta meg számottevően (SW480₁₀₀: $0,74 \pm 0,07\%$, SW480_{10.000}: $0,77 \pm 0,16\%$) (12. ábra/a).

A DAPI-festés mellett anti- γ -H2AX antitestet is alkalmaztunk, és meghatároztuk a γ -H2AX pozitivitást mutató mikronukleuszok arányát az összes mikronukleuszhoz viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy a kapott értékre (HT-29: $76,68 \pm 3,54\%$; SW480: $80,35 \pm 6,46\%$) nem gyakorolt hatást sem a sejtvonal típusa, sem az alkalmazott kezelési koncentráció.

5.2.1.2. Mikronukleuszok számának változása SAM-kezelés hatására

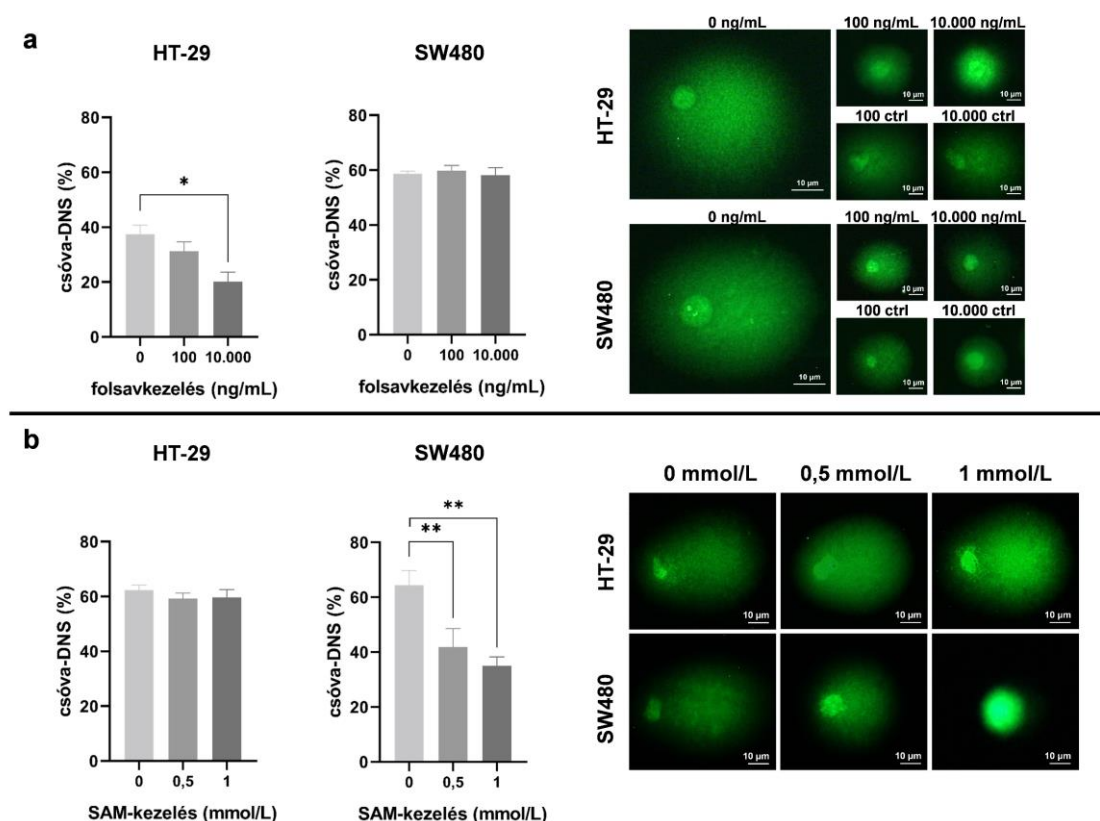
A két kontroll minta összehasonlításával megállapítottuk, hogy az SW480 sejtek esetén lényegesen magasabb volt a mikronukleuszok száma, mint a HT-29 sejtekben (HT-29₀: $0,19 \pm 0,02\%$; SW480₀: $2,75 \pm 0,25\%$). Ez az eredmény a folsavmentes médiumban tartott sejtekhez viszonyítva is kiemelkedőnek bizonyult. A SAM-kezelés szignifikáns ($p \leq 0,05$) változásokat okozott mindkét sejtvonal esetében (HT-29_{0,5}: $0,25 \pm 0,00\%$, HT-29₁: $0,04 \pm 0,01\%$; SW480_{0,5}: $1,26 \pm 0,12\%$, SW480₁: $0,91 \pm 0,11\%$). Az SW480 sejteknél azonban nem csupán nagyobb különbségeket tapasztaltunk a HT-29 mintákhoz viszonyítva, de a csökkenés jól láthatóan összhangban volt az alkalmazott SAM-koncentrációval is (12. ábra/b).

A folsavpótláshoz hasonlóan a SAM-kezelés sem befolyásolta a γ -H2AX pozitív mikronukleuszok arányát a két sejtvonalnál.

mutatott (HT-29₁₀₀: $31,23 \pm 3,41\%$, HT-29_{10.000}: $20,07 \pm 3,59\%$), míg az SW480 sejtekénél nem tapasztaltunk lényeges változásokat (SW480₁₀₀: $59,84 \pm 1,89\%$, SW480_{10.000}: $58,24 \pm 2,56\%$) (13. ábra/a).

5.2.2.2. A cometek hosszának változása SAM-kezelés hatására

A SAM-kezelés nem volt jelentős hatással a HT-29 sejtek csóva-DNS %-ára (HT-29₀: $62,29 \pm 1,82\%$, HT-29_{0,5}: $59,2 \pm 2,12\%$, HT-29₁: $59,69 \pm 2,81\%$), azonban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) és koncentrációarányosan csökkentette ezt a paramétert az SW480 sejtekben (SW480₀: $64,36 \pm 5,36\%$, SW480_{0,5}: $41,84 \pm 6,75\%$, SW480₁: $35,01 \pm 3,29\%$) (13. ábra/b).



13. ábra. Különböző folsav- (0, 100, 10.000 ng/mL), valamint S-adenozil-metionin- (0, 0,5, 1 mmol/L) koncentrációknak kitett HT-29 és SW480 sejtvonalak genomális instabilitásának vizsgálata comet próbával. Az egysejtes elektroforézis során keletkezett csókák DNS-tartalmának teljes sejtmagi DNS-mennyiséghez viszonyított arányát oszlopdiagramok reprezentálják a folsav- (a) és az S-adenozil-metionin- (b) kezelések esetében. A diagramok mellett láthatók az adott kísérlethez tartozó jellegzetes

csóvák [172,173]. ctrl: kontroll, SAM: S-adenozil-metionin ($*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$).

5.3. A folsav- és SAM-kezelés hatása a DNS-metilációra

5.3.1. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása

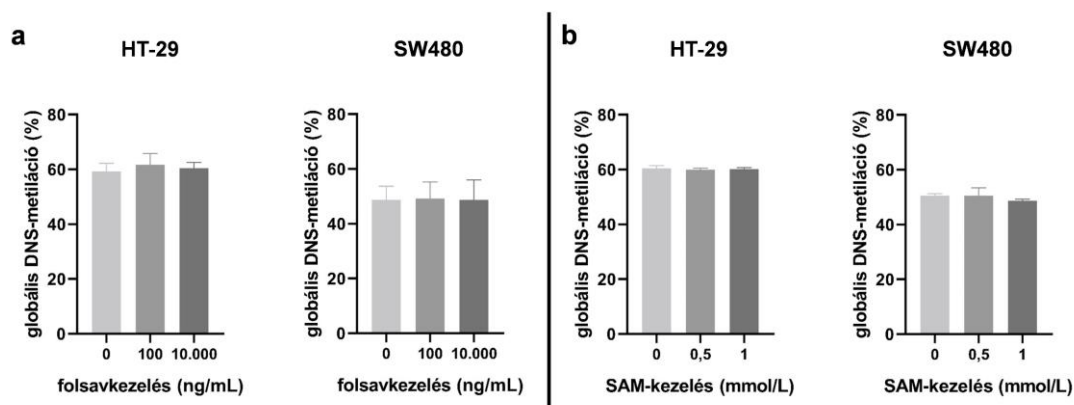
5.3.1.1. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása folsavkezelés hatására

Folsavmentes körülmények között a HT-29 sejtek LINE-1 metilációs szintje 10,54

%-kal volt magasabb, mint az SW480 sejtek esetén. Folsavpótlást követően azonban egyik sejtvonalnál sem figyeltünk meg kiemelkedő változást (HT-29₀: $59,30 \pm 2,90\%$, HT-29₁₀₀: $61,68 \pm 4,17\%$, HT-29_{10.000}: $60,42 \pm 2,12\%$; SW480₀: $48,76 \pm 4,93\%$, SW480₁₀₀: $49,15 \pm 6,13\%$, SW480_{10.000}: $48,73 \pm 7,27\%$) (14. ábra/a).

5.3.1.2. LINE-1 szakaszok DNS-metilációjának változása SAM-kezelés hatására

SAM-kezelés esetén ugyanazt figyeltük meg, mint amit a folsavval történő kísérletek során is tapasztaltunk. A HT-29 sejtek magasabb metilációs szinttel rendelkeztek a kontroll mintákat összehasonlítva, azonban a kezelőszer adása nem változtatta meg szignifikánsan ezeket az értékeket (HT-29₀: $60,40 \pm 0,99\%$, HT-29_{0,5}: $59,89 \pm 0,68\%$, HT-29₁: $60,14 \pm 0,64\%$; SW480₀: $50,58 \pm 0,71\%$, SW480_{0,5}: $52,08 \pm 1,32\%$, SW480₁: $48,65 \pm 0,64\%$) (14. ábra/b).



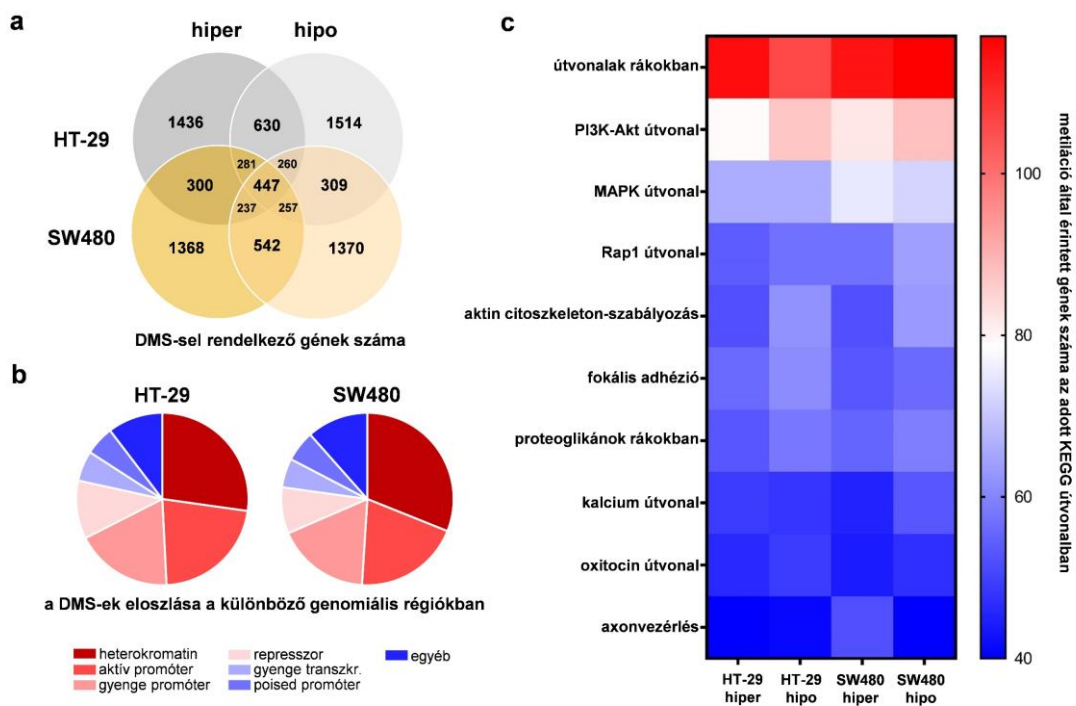
14. ábra. A HT-29 és SW480 sejtek globális DNS-metilációs szintjének meghatározása folsav- (a) és S-adenozil-metionin- (b) kezelést követően. Az előbbi esetben a sejteket folsavmentes (0 ng/mL), valamint 100 és 10.000 ng/mL folsavtartalmú médiumban tartottuk 72 órán keresztül, míg az utóbbi vizsgálat során 0,

0,5 és 1 mmol/L S-adenozil-metionin-koncentráció mellett 48 órás inkubációs időt alkalmaztunk. A globális DNS-metiláció szintjére a LINE-1 (long interspersed nuclear element-1; hosszú közbeiktatott sejtmagi egység-1) retrotranszpozon három különböző CpG (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid) - helyének átlagos metiláltsági értékéből következtettünk [172,173]. SAM: S-adenozil-metionin.

5.3.2. Genomszintű DNS-metilációs változások

5.3.2.1. Genomszintű DNS-metilációs változások folsavkezelés hatására

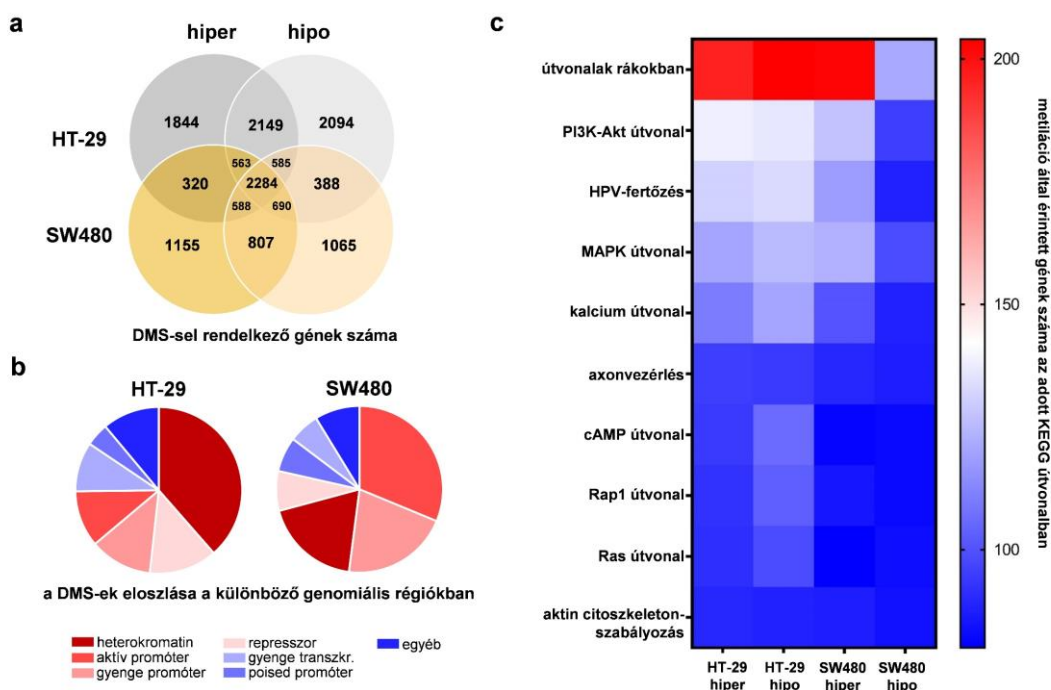
RRBS vizsgálattal azoknak a sejteknek a DNS-metilációs eredményeit hasonlítottuk össze, amelyek esetében folsavmentes médiumot vagy 10.000 ng/mL folsavat használtunk. Kezelés hatására a hipermetilálódott (HT-29_{hiper}: 3591; SW480_{hiper}: 3698) és hipometilálódott (HT-29_{hipo}: 3432; SW480_{hipo}: 3422) CpG-helyekkel rendelkező gének száma egy sejtvonalon belül, és a két sejtípus között is hasonló volt (15. ábra/a). A metilációs helyek többsége mindkét sejtnél a heterokromatin (HT-29: 27,57%; SW480: 31,61%), valamint az aktív (HT-29: 22,29%; SW480: 20,29%) és gyenge (HT-29: 18,57%; SW480: 17,81%) promóter szakaszokra esett (15. ábra/b). A KEGG útvonalanalízis eredményei alapján elsősorban a karcinogenezisben szerepet játszó gének voltak érintettek a metilációs változások által mindkét sejtvonal esetén (15. ábra/c).



15. ábra. A 10.000 ng/mL folsavkoncentrációval 72 órán keresztül kezelt HT-29 és SW480 sejtek genomszintű DNS-metilációs elemzése a folsavmentes (0 ng/mL) tápfolyadékban tartott mintákhoz viszonyítva. Az RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing; csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás) módszer használatával először meghatároztuk azoknak a géneknek a számát, amelyek vizsgált CpG- (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid) helyein metilációs változás történt. A „hiper” és „hipo” halmazok jelölik a hipermetilálódott, valamint a hipometilálódott CpG helyekkel rendelkező géneket. A közös halmazban azoknak a géneknek a száma látható, amelyekben mindkét fajta metilációs változáson átesett CpG-sziget megtalálható (a). A kördiagramok a kezelés hatására megváltozott metilációs státusszal bíró helyek pozícióját ábrázolják a genom különböző régióiban (b). A hőtérképen pedig az a 10 KEGG útvonal található, amelyekben a legtöbb metilációs változás által érintett gén vesz részt (c) [172]. DMS: differentially methylated site; megváltozott metilációs értéket adó hely, hiper: hipermetiláció, hipo: hipometiláció, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kiotói Gén és Genom Enciklopédia, transzkr.: transzkripció.

5.3.2.2. Genomszintű DNS-metilációs változások SAM-kezelés hatására

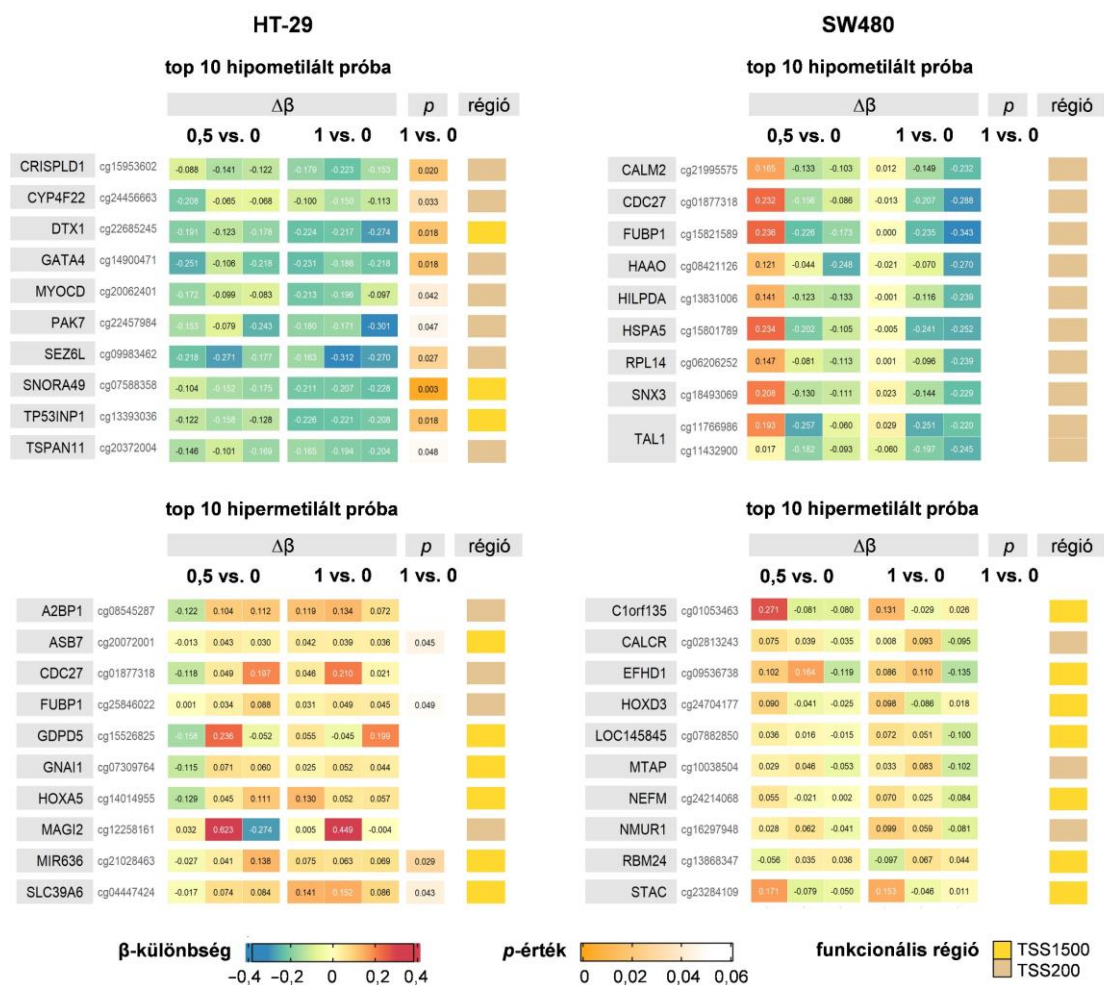
Az RRBS vizsgálat során kezeletlen és 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezelt mintákat használtunk. A metiláció által érintett gének száma lényegesen magasabb volt a HT-29 sejtek esetében az SW480-hoz, valamint a folsavas kezelés mintáihoz viszonyítva is. Emellett ebben a sejtvonalban enyhe eltérés mutatkozott a hipometilálódó gének javára (HT-29_{hiper}: 8333; HT-29_{hipo}: 8753), míg az SW480 sejteknél a két csoport génjeinek száma (SW480_{hiper}: 6407; SW480_{hipo}: 6407) megegyezett (16. ábra/a). A HT-29 sejtek esetében dominánsan a heterokromatin régióban következtek be metilációs változások (38,56%), amit a represszor szakasz követett (13,17%), míg az SW480 sejteknél az aktív (31,24%) és a gyenge promóterekben (20,80%) tapasztaltuk a legtöbb változó metilációt mutató helyet (16. ábra/b). Az útvonalelemzés a folsavkezeléshez hasonlóan itt is rávilágított arra, hogy a SAM adása a DNS-metiláció tekintetében elsősorban a karcinogenezisben részt vevő géneket érinti (16. ábra/c).



16. ábra. Az 1 mmol/L S-adenozil-metionin-koncentrációval 48 órán keresztül kezelt HT-29 és SW480 sejtek genomszintű DNS-metilációs elemzése a kontroll (0 mmol/L) mintákhoz viszonyítva. Az RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing; csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás) módszer használatával először meghatároztuk azoknak a géneknek a számát, amelyek vizsgált CpG- (cytosine-

phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid) helyein metilációs változás történt. A „hiper” és „hipo” halmazok jelölik a hipermetilálódott, valamint a hipometilálódott CpG-helyekkel rendelkező géneket. A közös halmazban azoknak a géneknek a száma látható, amelyekben mindkét fajta metilációs változáson átesett CpG-sziget megtalálható (a). A kördiagramok a kezelés hatására megváltozott metilációs státusszal bíró helyek pozícióját ábrázolják a genom különböző régióiban (b). A hőtérképen pedig az a 10 KEGG útvonal található, amelyekben a legtöbb metilációs változás által érintett gén vesz részt (c). DMS: differentially methylated site; megváltozott metilációs értéket adó hely, hiper: hipermetiláció, hipo: hipometiláció, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kiotói Gén és Genom Enciklopédia, transzkri.: transzkripció.

A SAM-kezelés következtében kialakuló DNS-metilációs változásokat a promóter szakaszokra eső CpG-szigetekben Illumina EPIC BeadChip módszerrel elemeztük. Arra a top 10 hipo- és hipermetilálódó CpG helyre fókuszáltunk, amelyek a legnagyobb metilációs változást ($\Delta\beta$) mutatták a kezelés hatására. Kedvező hatásúnak bizonyult azoknak a géneknek (HT-29: *DTX1*, *GATA4*, *SEZ6L*, *TP53INP1*; SW480: *HAAO*, *TAL1*) a csökkent metilációja, amelyek hipermetilációja az irodalmi adatok szerint összefüggésben volt a daganatos progresszióval (17. ábra).



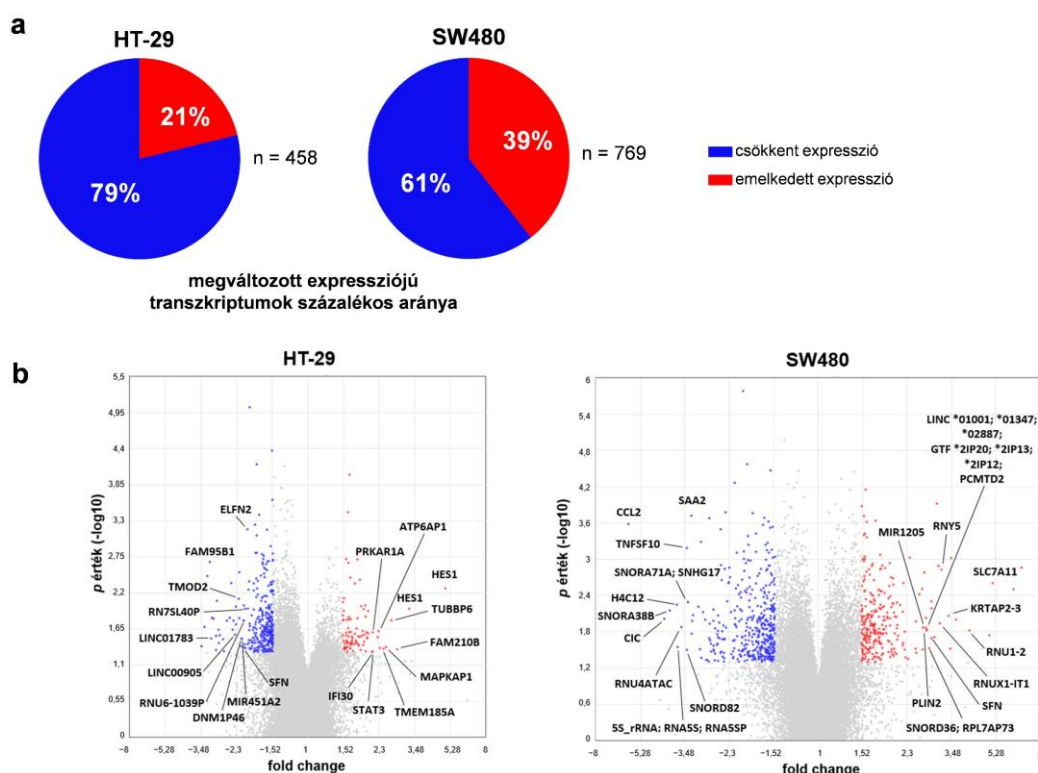
17. ábra. A Bead Chip módszerrel detektált legnagyobb hipo- vagy hipermetilációs változást ($\Delta\beta$) mutató CpG- (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide; citozin-foszfát-guanin dinukleotid) helyek (próbák) a HT-29 és SW480 sejtvonalakban, 48 órás 0,5, valamint 1 mmol/L S-adenozil-metionin-kezelést követően [173].

5.4. A folsav- és SAM-kezelés hatása a génexpresszióra

5.4.1. Génexpressziós változások folsavkezelés hatására

Megfigyeltük, hogy a folsav adását követően a csökkent kifejeződést mutató transzkriptumok száma dominált, ami főként a HT-29 sejteknél volt szembetűnő (HT-29: 78,82% alul- és 21,18% felülexpresszáldott; SW480: 60,60% alul- és 39,40% felülexpresszáldott) (18. ábra/a). Azonban a megváltozott expresszióval rendelkező transzkriptumok száma (HT-29: 458; SW480: 769) és a változások mértéke (FC) is az SW480 sejtekben bizonyult nagyobbak. A HT-29 sejtekben a *HES1* gén két

transzkriptuma (TC03001071.hg, TC03002732.hg) rendelkezett a legmagasabb FC-értékkel (FC: 4,98 és 3,27), míg a *FAM95B1* gén (TC01003063.hg, TC09001384.hg) mutatta a legnagyobb expressziós csökkenést (FC: -3,15 és -3,15) a kezelést követően. Az SW480 sejtvonalban az *SLC7A11* gén kifejeződésében figyeltük meg a legnagyobb növekedést (FC: 5,12), a *CCL2* (FC: -5,90) génben pedig a legnagyobb csökkenést folsavadás után (18. ábra/b).

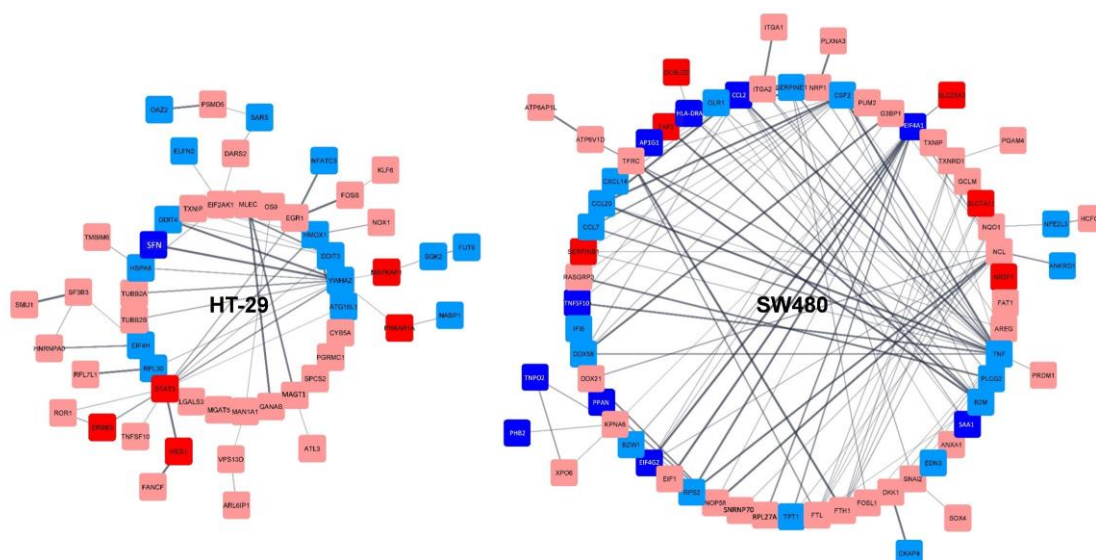


18. ábra. A HT-29 és SW480 sejtvonalak transzkriptomikai elemzése Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) módszerrel 72 órás 10.000 ng/mL folsavpótlást követően. A kördiagramok a kezelés hatására emelkedett, illetve csökkent kifejeződést mutató transzkriptumok százalékos arányát jelölik (a). Vulkáncdiagramon tüntettük fel azt a 10-10 gént, amelyek sejtvonalanként a legnagyobb expressziós változással rendelkeznek. A szürke pontok ábrázolják a HTA 2.0 chip által detektálható transzkriptumokat, míg a szignifikáns ($p \leq 0,05$) és magasabb, mint 1,5-ös, valamint alacsonyabb, mint -1,5-ös intenzitásváltozást (fold change) mutató géneket piros és kék pontokkal jelöltük (b) [172].

Folsavpótlást követően nem tapasztaltunk szignifikáns transzkriptomikai változásokat

ismert biokémiai folyamatokban. A PANTHER klasszifikációs rendszer segítségével lefuttatott elemzés által a PDGF (platelet-derived growth factor; vérlemezke eredetű növekedési faktor) útvonal bizonyult a leginkább érintettnek a HT-29 sejtvonalban, amelynek hét génye (*FOSB*, *RAB11B*, *SRGAP1*, *SRGAP2*, *SRGAP2B*, *SRGAP2C* és *STAT3*) változott a kritériumainknak ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,5|$) megfelelően. Ezen gének mindegyike felülexpresszáldott a kezelés hatására. Az SW480 sejteket illetően a „kemokinek és citokinek által közvetített gyulladásos útvonal”-nál (inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling) figyeltük meg a legmarkánsabb folsavhatást, ugyanis 5 génjének (*CCL2*, *CCL7*, *CCL20*, *ITGA2* és *PLCG2*) expressziója mutatott eltérést. Az *ITGA2* kivételével mindegyiknek csökkent az expressziója.

A Cytoscape alkalmazással készített fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózat, amely a vizsgált gének által kódolt fehérjék közötti kapcsolatrendszer ábrázolja, összetettebb volt az SW480 sejtvonalban a HT-29-hez viszonyítva (HT-29: 113 csomópont és 82 összeköttetés; SW480: 186 csomópont és 221 összeköttetés). A kapcsolatok száma alapján a HT-29 sejteknél a YWHAZ (11 összeköttetés), míg az SW480 sejteknél a TNF (27 összeköttetés) volt a hálózat kulcsfehérjéje (19. ábra).

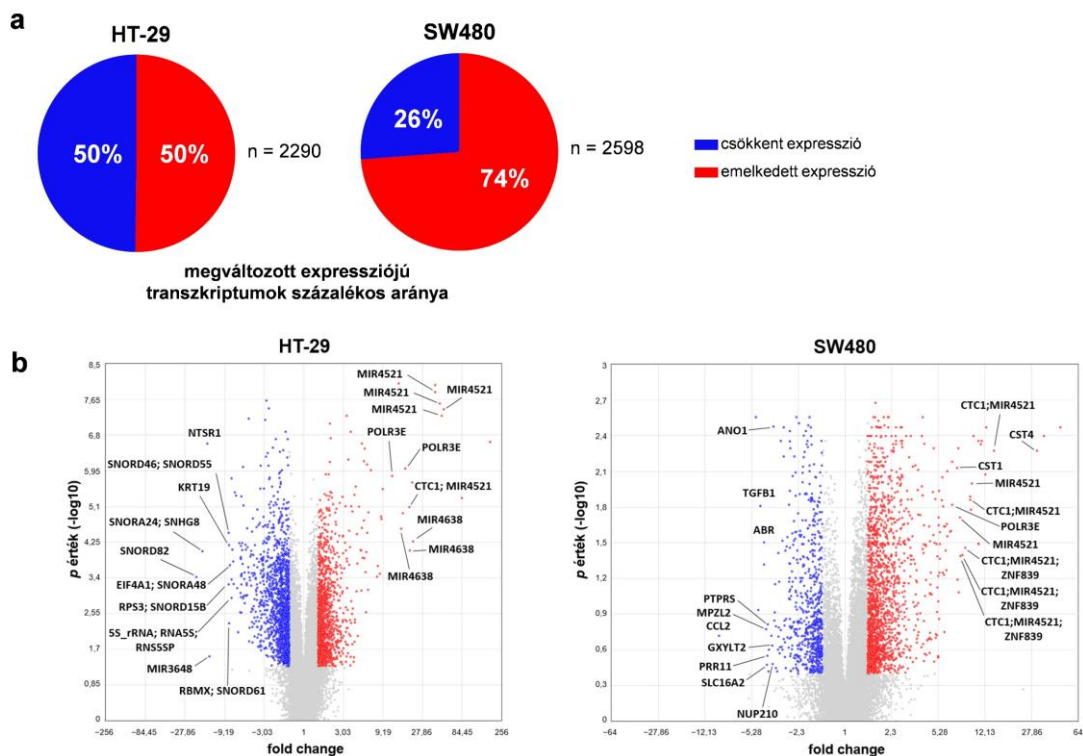


19. ábra. A HT-29 és SW480 sejtvonalak Cytoscape szoftverrel létrehozott fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózata 72 órás 10,000 ng/mL folsavkezelést követően. A kapcsolatrendszer azokat a fehérjéket ábrázolja, amelyek kódoló gényei a folsavpótlás hatására szignifikáns ($p \leq 0,05$) és $\geq |1,5|$ expressziós intenzitásváltozást (FC; fold

change) mutatnak. A transzkripció szintjét színekódolással jelöltük (sötétkék: $FC \leq -2$, világoskék: $FC \geq -2$ és $\leq -1,5$, rózsaszín: $FC \geq 1,5$ és ≤ 2 , piros: $FC \geq 2$) [172].

5.4.2. Génexpressziós változások SAM-kezelés hatására

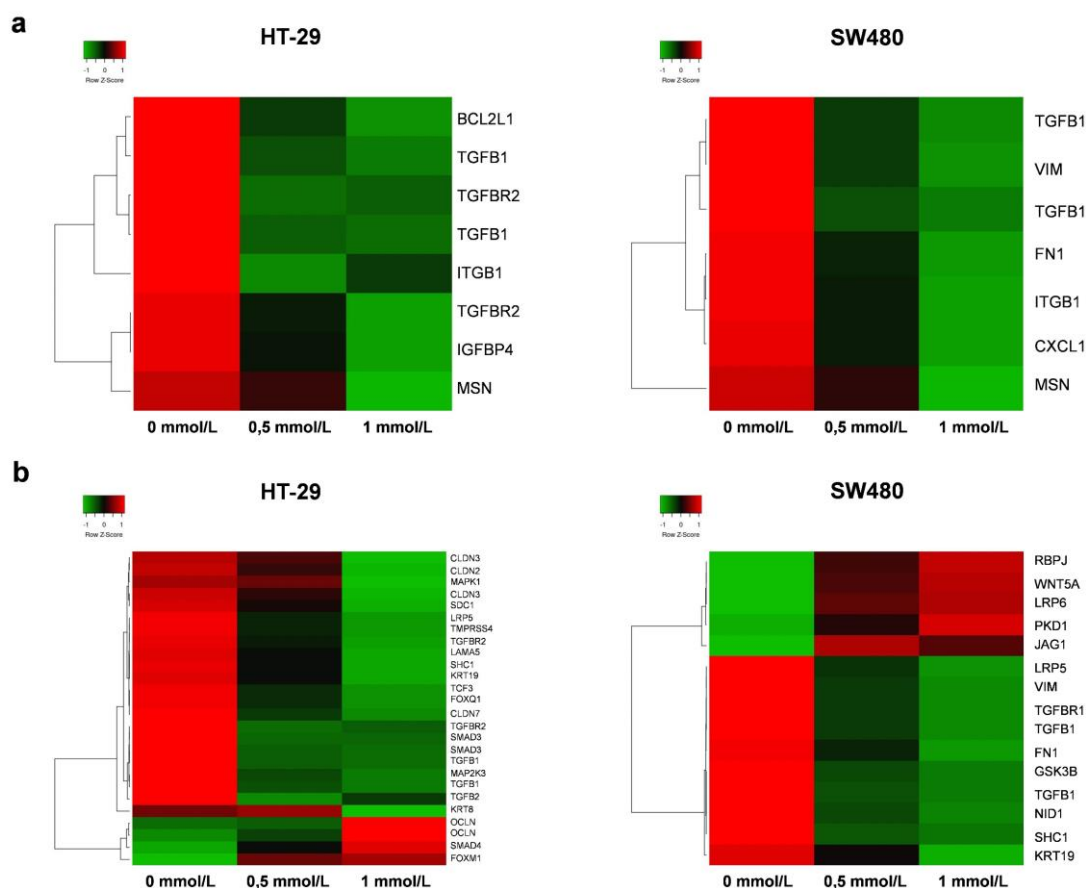
SAM-kezelés hatására a HT-29 sejtekben közel egyforma arányban fordultak elő az emelkedett (50,17%) és csökkent (49,83%) kifejeződést mutató transzkriptumok. Ezzel szemben az SW480 sejteknél jelentősen domináltak azok, amelyeknek növekedett az átíródása (26,21% alul- és 73,79% felülexpresszáldott). Az érintett transzkriptumok száma (HT-29: 2290; SW480: 2598) a folsavas kísérletekhez hasonlóan itt is az SW480 sejtek esetében volt magasabb, azonban ezek az értékek többszöröse voltak annak mint, amit a folsavpótlást követően mértünk (20. ábra/a). A pozitív és negatív irányú változások kiterjedtségében szintén lényegesen nagyobb különbségek mutatkoztak a SAM-kezelés hatására a folsav adásához képest. A HT-29 sejtek esetében a *MIR4521* génhez társítható transzkriptumoknak (TC06001447.hg, TC15001239.hg, TC06001356.hg, TC06000222.hg, TC06000239.hg) detektáltuk a legnagyobb pozitív irányú változását (FC: 50,64, 50,64, 47,78, 45,3, 39,75), a legalacsonyabb FC-értéket pedig a *SNORD82* génnél (TC02002862.hg) figyeltük meg (FC: -20,22). Az SW480 sejtekben a *CST4* gén (TC20000717.hg) expressziója növekedett a legnagyobb mértékben (FC: 30,60) és csakúgy, mint a folsav adását követően, a *CCL2* gén (TC17000383.hg) esetében tapasztaltuk a legmagasabb intenzitáscsökkenést (FC: -9,47) (20. ábra/b).



20. ábra. A HT-29 és SW480 sejtvonalak transzkriptomikai elemzése Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) módszerrel 48 órás 1 mmol/L S-adenozil-metionin-adást követően. A kördiagramok a kezelés hatására emelkedett, illetve csökkent kifejeződést mutató gének százalékos arányát jelölik (a). Vulkándiagramon tüntettük fel azt a 10-10 gént, amelyek sejtvonalanként a legnagyobb expressziós változással rendelkeznek. A szürke pontok ábrázolják a HTA 2.0 chip által detektálható transzkriptumokat, míg a szignifikáns ($p \leq 0,05$) és magasabb, mint 1,5-ös, valamint alacsonyabb, mint -1,5-ös intenzitásváltozást (fold change) mutató géneket piros és kék pontokkal jelöltük (b).

A SAM nem csak az érintett gének számát és kifejeződésük mértékét tekintve volt jelentős hatással a transzkripcióra, hanem a mintázatait illetően is. A kezelés ugyanis számottevően befolyásolt több tumorprogresszió szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró útvonalat. Az első ilyen jellegű metabolikus rendszer, amit vizsgáltunk egy Bakhoun és munkatársai által összeállított kromoszómálisan instabil ráksejtekre jellemző EMT/migráció/metasztázis géncsoport volt [174]. Ezen gének közül mindegyik, amelyek megfelelt a kritériumainknak ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,4|$), alacsonyabb expressziót mutatott a kezelés hatására (21. ábra/a). Következő lépésként a kolorektális karcinogenezisre

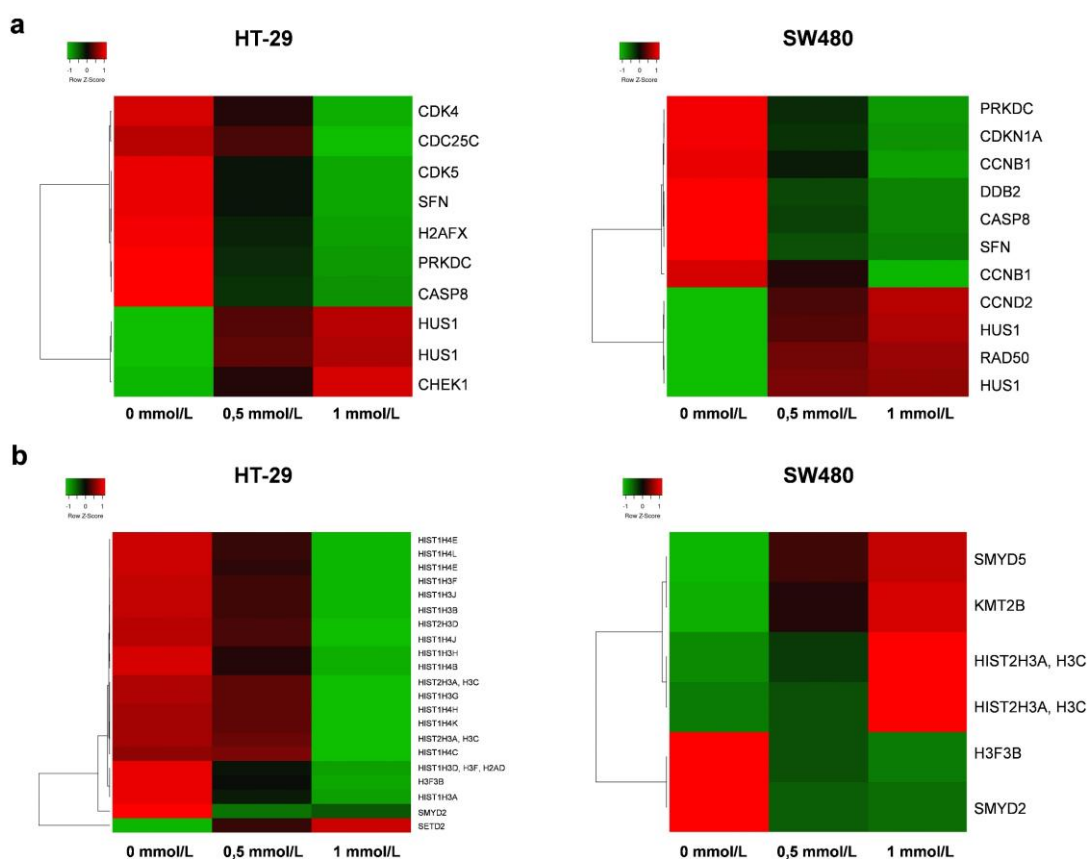
jellemző EMT-t vizsgáltuk meg, és azt tapasztaltuk, hogy a folyamatban részt vevő gének nagy hányadának csökkent a kifejeződése (21.ábra/b). Érdekes külön kiemelni az említett folyamatokban meghatározó szerepet játszó *TGFB1*-et, amely mindkét sejtvonal esetében előkelő helyet foglalt el a kezelés hatására csökkenő expressziót mutató gének listáján (HT-29: -6,91; SW480: -4,52).



21. ábra. A HT-29 és SW480 sejtvonalak transzkriptomikai elemzése Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) módszerrel 0, 0,5, valamint 1 mmol/L S-adenozil-metionin- (SAM) koncentráció 48 órás alkalmazása mellett. A génexpressziós vizsgálat során a Bakhoun és munkatársai által összeállított kromoszomálisan instabil ráksejtekre jellemző epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT)/migráció/metasztázis géncsoportot [174] (a), valamint a kolorektális karcinogenezisre jellemző EMT útvonalat (b) ábrázoltuk hő térképen. Csak azokat a transzkriptumokat jelenítettük meg, amelyek szignifikáns ($p \leq 0,05$) és $\geq |1,4|$ intenzitásváltozást mutattak a 0 és 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezelt minták

összehasonlításakor. Az oszlopok az alkalmazott SAM-dózisokat, a sorok pedig a HTA 2.0 által detektálható géntanszkriptumokat jelölik. A zöld szín az expresszió csökkenésre, a piros szín pedig a növekedésre utal [173].

Megfigyeltük, hogy SAM-kezelés hatására a tumorprogresszióban szerepet játszó útvonalak mellett a genomiális stabilitásért felelős gének is jelentős expressziós változásokat mutattak. A DDR útvonal esetében mindkét sejtvonalnál csökkent számos gén, köztük az *CASP8*, *PRKDC* és *SFN* expressziója (22. ábra/a). A hisztonmódosulásokban részt vevő gének kifejeződése azonban eltérően változott a két sejtvonalban. Míg a HT-29 sejteknél a *SETD2* kivételével mindegyik gén expressziója csökkent, az SW480 mintákban inkább az intenzitásnövekedés volt jellemző a kezelést követően (22. ábra/b).



22. ábra. A HT-29 és SW480 sejtvonalak transzkriptomikai elemzése Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) módszerrel 0, 0,5, valamint 1 mmol/L S-adenozil-metionin- (SAM) koncentráció 48 órás alkalmazása mellett. A

génexpressziós vizsgálat során a DNS-károsodásra reagáló (DDR; DNA damage response) (a), valamint a hisztonmódosulásokban részt vevő útvonalakat (b) ábráztuk hő térképen. Csak azokat a transzkriptumokat jelenítettük meg, amelyek szignifikáns ($p \leq 0,05$) és $\geq |1,4|$ intenzitásváltozást mutattak a 0 és 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezelt minták összehasonlításakor. Az oszlopok az alkalmazott SAM-dózisokat, a sorok pedig a HTA 2.0 által detektálható géntranszkriptumokat jelölik. A zöld szín az expresszió csökkenésre, a piros szín pedig a növekedésre utal [173].

5.5. A promótermetilációs és génexpressziós változásokra vonatkozó eredményeink összevetése

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a kritériumaink ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,5|$) szerinti intenzitáskülönbséggel rendelkező gének expressziója összefüggésben áll-e a promóterük szignifikáns ($p \leq 0,05$) metilációs változásaival a kezeléseket követően. Tehát kíváncsiak voltunk arra, hogy tapasztalunk-e az adott génben promóter-hipermetiláció esetén csökkenést, és -hipometiláció esetén növekedést a transzkripcióban.

5.5.1. A promótermetilációs státusz és a génexpresszió együttes változása folsavkezelés hatására

A HT-29 sejtekben négy (*ATG16L1*, *NABP1*, *RPPH1* és *TCEAL1*), az SW480 sejtekben pedig öt (*EIF4G2*, *IFI6*, *NEU3*, *RAB31* és *SESN3*) gén promóterének metilálódásához tudtunk csökkenő expressziós értékeket társítani. A promóter-hipometiláció a HT-29 mintákban tíz (*BIVM*, *DHRS3*, *ERBB3*, *LGALS3*, *MAPKAP1*, *ROR1*, *SKIL*, *SLC39A8*, *TMBIM6* és *TUBB2B*), az SW480 sejtvonalnál azonban nyolc (*FOSL1*, *NBPFF8*, *NR2F1*, *NTSR1*, *SERPINB1*, *SNRNP70*, *STC2* és *WDR1*) génnél volt összeegyeztethető a megnövekedett transzkripcióval.

5.5.2. A promótermetilációs státusz és a génexpresszió együttes változása SAM-kezelés hatására

A SAM-kezelés hatására a fentebb ismertetett eredményekhez képest lényegesen szorosabb kapcsolatot találtunk a promótermetiláció és a génexpresszió között. A HT-29 sejtekben 193, az SW480 sejtekben pedig 216 gén promóterének hipermetilációja volt egyidejűleg megfigyelhető csökkent kifejeződésével. A kezelés következtében

hipometilálódó promóter régió, és ezzel párhuzamosan a megnövekedett expressziós intenzitás a HT-29 sejtekben 102, az SW480 sejtekben azonban 204 gént érintett. A korábban bemutatott karcinogenezissel összefüggő útvonalak génjei közül átfedést tapasztaltunk a promótermetiláció és a génexpresszió között a *BCL2L1*, *IGFBP4*, *LRP5* esetében a HT-29 sejtvonal vizsgálatakor, valamint a *FN1*, *GSK3B*, *JAG1*, *LRP5*, *LRP6*, *NIP1*, *RBPJ*, *SHC1*, *TGFB1*, *TGFBR1* esetében az SW480 sejtvonalban. A genetikai instabilitás tekintetében a HT-29 sejtekben a *CDK4*, *CDK5*, *SETD2*, *SFN* és *SMYD2*, az SW480 sejtekben pedig a *HUS1*, *RAD50*, *SMYD2* és *SMYD5* gének mutattak ilyen irányú összefüggést.

5.6. A sejtvonalak mutációs profiljának felállítása az onkogének és az 1C metabolizmus génjeinek vonatkozásában

Teljesexom-szekvenálással vizsgáltuk meg a folsav- és a SAM-kezelés hatását a sejtvonalak mutációs számára. A folsavmentes médiumban tartott sejtekhez képest a 10.000 ng/mL folsavkezelés a HT-29 sejtekben 195-tel (HT-29₀: 9822, HT-29_{10.000}: 10.017), az SW480 sejtekben pedig 131-gyel (SW480₀: 8091, SW480_{10.000}: 8222) növelte meg ezt az értéket. A SAM két koncentrációjának (0 és 1 mmol/L) alkalmazása esetén nem vettünk észre számottevő különbséget a kapott eredményekben sem a HT-29 (HT-29₀: 9522, HT-29₁: 9649), sem az SW480 esetén (SW480₀: 8141, SW480₁: 8175). Az azonban megállapítható, hogy a HT-29 sejtek mindkét kísérletben legalább 1300-zal magasabb mutációs számmal rendelkeztek, mint az SW480 sejtvonal.

Ezt követően megvizsgáltuk a tumorprogresszióban és az 1C metabolizmusban szerepet játszó gének mutációs profilját. Először azokra a génekre fókuszáltunk, amelyek feltehetően onkogén funkciót látnak el az OnkoKB adatbázis alapján. Számos hasonlóságot vettünk észre a sejtvonalak között, ugyanis mindkettő sejtípus *ARID4B*, *DNMT3B*, *ERBB2*, *HLA-A*, *HLA-B*, *KDR*, *KIT*, *KMT2C*, *MLH1* és *TP53* mutáns volt ugyanarra az allélra. Azonban csak a HT-29 bizonyult *BRAF*, *EGFR*, *PIK3CA*, *SMAD4* mutánsnak, és egyedül az SW480 sejteknél mutattunk ki *KRAS*, valamint *MSH6* mutációt (2. táblázat).

2. táblázat. A HT-29 és SW480 sejtvonalak onkogénjeinek exomszekvenálás által elemzett mutációs profilja. A vizsgálatból az intronikus variánsok kizárásra kerültek, és

a táblázat csak azokat a mutált géneket tartalmazza, amelyek az OnkoKB adatbázis alapján potenciálisan onkogénnek tekinthetők. A szürke színek jelölik a mutációkat az adott variánsok esetén [173]. *: nonszensz mutáció, =: csendes mutáció, fs*: frameshift mutation; kereteltolódásos mutáció.

gén	variáns	HT-29	SW480
APC	E853*		
	Q1338*		
	T1556Nfs*3		
ARID4B	E299=		
AURKA	F31I		
BRAF	V600E		
CDKN1B	V109G		
CTLA4	T17A		
DNMT3B	Y558=		
EGFR	R521K		
ERBB2	I655V		
	P1170A		
ERCC2	D312N		
FANCA	S1088F		
HLA-A	A24=		
	D251Tfs*46		
	G107Afs*71		
	L180*		
	R106Afs*16		

gén	variáns	HT-29	SW480
HLA-A	T206=		
HLA-B	A206=		
	E69Dfs*30		
	Q94Hfs*4		
	Q94Nfs*58		
HNF1A	I27L		
KDR	Q472H		
KIT	M541L		
KMT2C	Y856*		
KRAS	G12V		
MLH1	I219V		
MSH6	G39E		
PIK3CA	P449T		
PMS2	K541E		
	P470S		
SMAD4	Q311*		
TP53	R273H		
XRCC2	R188H		

Végül megvizsgáltuk azoknak a géneknek az érintettségét, amelyek az 1C metabolizmus enzimeit kódolják. A 30 vizsgált fehérje közül kilencnél volt megfigyelhető valamilyen mutáció a HT-29 és szintén kilencnél az SW480 sejtekben, míg nyolc mutáció mindkét sejtvonalat érintett. A tanulmányozott enzimek közül a folsav- és SAM-hatás szempontjából az MTHFR-nek és a DNMT-knek van a legnagyobb jelentősége. A szekvenálási adatokból kiderült, hogy a HT-29 sejtek heterozigóták az MTHFR enzim C677T (A222V) és A1298C (E429A) variánsaira, az SW480 sejtek pedig homozigóták a C677T (A222V) variánsra. A DNS-metiláló enzimek esetében kimutattuk, hogy a DNMT1 az SW480 sejtekben, a DNMT3b pedig mindkét sejtvonalban mutált volt (3. táblázat).

3. táblázat. A HT-29 és SW480 sejtvonalak mutációs profilja az 1C (egy szénatomos) ciklus génjeinek tekintetében. A vizsgálandó gének csoportját a WikiPathways adatbázis segítségével határoztuk meg. Az elemzésből az intronikus variánsok kizárásra

kerültek, és a táblázat csak a mutált géneket tartalmazza. A szürke színek jelölik a mutációkat az adott variánsok esetén. =: csendes mutáció, mutated: mutált, de nem annotálható variáns.

gén	variáns	HT-29	SW480
<i>GART</i>	V421I		
	D752G		
<i>MAT2B</i>	L175=		
<i>MTHFD1</i>	K134R		
	R653Q		
<i>MTHFR</i>	A222V		
	E429A		
<i>MTRR</i>	I49M		
	K377R		
	H622Y		

gén	variáns	HT-29	SW480
<i>ALDH1L1</i>	A763S		
<i>ATIC</i>	T116S		
<i>CHDH</i>	L78R		
<i>DNMT1</i>	MUTATED		
<i>DNMT3B</i>	Y558=		
	MUTATED		
<i>FOLH1</i>	G172=		
	R190W		
	N350D		
	H475Y		

6. MEGBESZÉLÉS

PhD-munkám során két metildonor, a folsav és a SAM vastagbélráksejtekre kifejtett hatásának vizsgálatával foglalkoztam. Ezen molekulák elsősorban a metilcsoportjuk átadásával kapcsolatos reakcióikról ismeretesek, azonban biokémiai szerepük ennél lényegesen szerteágazóbb [25,35].

A folsav mellett, hogy részt vesz a SAM bioszintézisében, fontos eleme a nukleotidok, valamint a fehérjék képződésének [35]. A SAM pedig univerzális metildonor szerepéből kifolyólag, nem csak epigenetikai szabályozást lát el, hanem metiláció által segíti az RNS, a hormonok, a foszfolipidek, vagy a neurotranszmitterek működését [25,26]. Emellett az aminopropilációs és transzszulfurációs reakciók megvalósulását is lehetővé teszi [25,151]. Nem meglepő tehát, hogy mindkét molekula nélkülözhetetlen a megfelelő sejtfunkciókhoz, ezáltal az egészségi állapotot is befolyásolják [25,35].

Széleskörű hatásmechanizmusuk okán többféle kórállapot kezelésére használják őket. Folsavpótlás hatására megelőzhetővé, vagy akár gyógyíthatóvá válik a megaloblasztos anémia, a kardiovaszkuláris és neuropszichiátriai megbetegedések, valamint a szülészeti komplikációk és fejlődési rendellenességek is [125-128]. A SAM pedig alkalmas többek között a depresszió, az Alzheimer-kór, az intrahepatikus epepangás, a májkárosodás, továbbá az oszteoartritisz kezelésére [25,158-160]. Daganatos megbetegedések esetén szerepük azonban jelentősen különbözik. A SAM-ról kutatási eredmények alapján kijelenthető, hogy jótékony a tumorok progressziójának mérséklésében, azáltal, hogy képes epigenetikai újraprogramozást végrehajtani a daganatos sejtekben [158,161-164]. A folsavat azonban a DNS-szintézisben és a DNS-metilációban betöltött kettős szerepe miatt úgy ismerhetjük, mint a tumorgenezis kétélű kardját [139]. Egészséges egyénekben ugyanis megakadályozza a nukleotidok szintjében fellépő aránytalanságot, valamint a globális hipometilációt, tehát használatával megelőzhető a genomiális instabilitás kialakulása [35,124,139]. Azonban a nukleotidok fokozott képzésével és a tumorsuppresszor gének promóterének metilálásával elősegítheti a már meglévő tumor progresszióját [35,175,176].

Ezen folyamatok háttere még nem teljesen tisztázott, ezért kutatásunkban célul tűztük ki, hogy molekuláris biológiai módszerek széles repertoárjával több szempontból is

megvizsgáljuk két humán vastagbélrák sejtvonal folsav- és SAM-kezelést követő változásait.

A sejtvonalak kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy a leggyakoribb CRC kialakulási útvonal, a CIN jellegzetességeit mutassák, azonban a tumor heterogenitás vizsgálata szempontjából rendelkezzenek alapvető genomiális és epigenomiális különbségekkel [63]. Így a CIN+, CIMP+ és *BRAF* mutáns HT-29, és a CIN+, CIMP– és *KRAS* mutáns SW480 sejtek használata mellett döntöttünk [101,177,178]. A vizsgált sejtvonalak a CRC-k transzkriptomikai jellegzetességein alapuló CMS osztályozás szerint is külön csoportba tartoznak. Ennek alapján a HT-29 sejtek a metabolikai szabályozási zavarral jellemzett CMS3, míg az SW480 sejtek a TGFβ/integrin útvonal aktivációt, EMT-t, valamint erőteljes stromális inváziót és angiogenezist mutató CMS4 osztály részét képezik [101,177].

Mindkét kezelőszert három különböző mennyiségben alkalmaztuk. Folsavval folytatott kísérleteinkben a folsavmentes közeg (0 ng/mL) mellett a fiziológiás pótlással biztosítható 100 ng/mL, valamint egy szélsőségesen magas folsavdózis, a 10.000 ng/mL adására került sor [166]. SAM esetében irodalmi adatokra és korábbi citotoxicitási eredményeinkre támaszkodva 0, 0,5 és 1 mmol/L koncentrációt alkalmaztunk [162,167,168]. A metodikák kiválasztásánál olyan szempontok vizsgálatát céloztuk meg, amelyeket eddigi ismereteink alapján a folsav és a SAM befolyásolhat.

6.1. A folsav- és SAM-kezelés hatása a sejtproliferációra, sejtvitalitásra és sejtciklusra

A folsav 100 ng/mL mennyiségben történő alkalmazásakor a HT-29 sejtekben jelentős emelkedést tapasztaltunk a proliferációt és a vitalitást illetően a másik két kezelési koncentrációhoz képest. A jelenség, amelynek hátterében feltételezhetően a folsav nukleotidszintézisben betöltött szerepe állhat, összhangban volt a Pellis és munkatársai által tett megfigyelésekkel [166,175]. Érdekes módon azonban a szuprafiziológiás folsavadás a folsavmentes közegben tartott sejtekhez képest is alacsonyabb proliferációs és vitalitási értékeket idézett elő. Korábbi kutatások azt bizonyították, hogy hasonló folsavmennyiség használata mellett a CRC (HT-29, COLO-25, LoVo), valamint endotheliális és orrgaratsejtek ugyanilyen változásokat mutattak. A kapott

eredményeket pedig a folátreceptor- α által szabályozott ERK (extracelluláris szignál regulált kináz) útvonal aktiválódásával magyarázták [179-181]. Az SW480 sejtekben a proliferáció és a viabilitás tekintetében sem figyeltünk meg változásokat folsavadáskövetően. Farias és munkatársai szintén rávilágítottak arra, hogy az SW480 sejtek eltérően reagáltak a folsavkezelésre, mint más CRC sejtvonalak (HCT116, LS174T) [139]. Bár a HT-29 és SW480 sejtek különböztek a sejtciklus fázisok eloszlását illetően, a folsavpótlás ebben nem okozott kiemelkedő változást.

A SAM-kezelésről korábban már bebizonyították, hogy hatékonyan képes megfékezni a daganatsejteket, köztük a HT-29 sejt vonal osztódását [182]. Az eredményeink összhangban voltak ezzel az állítással, ugyanis koncentrációarányosan és magas szignifikanciaértékekkel csökkent a proliferáció mindkét sejt vonal esetén. A SAM azonban nem volt hatással a minták életképességére. A sejtciklusváltozások vonatkozásában szintén hasonlóságot figyeltünk meg a HT-29 és SW480 sejt vonalak között, ugyanis a G0/G1-fázis rovására szignifikánsan nőtt az S- és G2/M-fázis sejtjeinek száma. A sejtek a kezelés hatására legnagyobb számban az S-fázisban halmozódtak fel, amiből a DNS-hibajavítás aktiválódására utaló, intra-S-ellenőrzőpont működésbe lépésére következtettünk [56].

6.2. A folsav- és SAM-kezelés hatása a genom stabilitására

A nukleotidok számában bekövetkező egyensúlytalanság és a globális DNS-metiláció szintjének csökkenése a genom integritásának hanyatlását idézheti elő [20,183]. A folsav pótlása mindkét, a SAM-kezelés pedig az utóbbi körülmény helyreállítását célozhatja meg [25,26,107]. Így a következő vizsgálati tárgykörünket a genomiális stabilitás képezte, amelyhez mikronukleusz-számolást és comet próbát alkalmaztunk. Azt előljáróban kijelenthetjük, hogy a HT-29 sejtek kezeléstől függetlenül magasabb genomiális stabilitással rendelkeztek, mint az SW480 sejt vonal, ami vélhetően CIMP-pozitivitásukkal volt magyarázható.

Folsavpótlás hatására a mikronukleusz szám és a DNS-csóva hossza is szignifikánsan csökkent a HT-29 sejt vonalban. Tehát hasonlóan Catala és munkatársai vastagbélhám- és kötőszöveti sejteken végzett kísérletéhez, a folsav adása növelte a genom integritását [184]. Ezzel szemben a kezelés nem okozott lényeges változást az SW480 sejtekben.

A folsavas kísérleteinkkel szemben a SAM-kezelés a HT-29 helyett elsősorban az SW480 sejtekre hatott, hiszen ezekben a mintákban mind a mikronukleusz számot, mind a DNS-csóva hosszát csökkentette. Ramírez és munkatársai leírták, hogy a SAM a globális hipometiláció mérséklésén túl a mikrotubulusok metilálásában betöltött szerepének köszönhetően is növelheti a genom integritását. Ez utóbbi folyamat ugyanis kromatinkondenzációhoz vezetve megakadályozhatja a kromoszómavesztést, avagy a mikronukleusz-képződést a sejtosztódás során [185,186].

6.3. A folsav- és SAM-kezelés hatása a DNS-metilációra

A két általunk alkalmazott molekula metildonor funkciót lát el, tehát jelentős szerepük van a DNS-metilációban. Míg a SAM közvetlenül szolgáltatja metilcsoportját a DNS számára, a folsav ezt kizárólag a SAM szintézisen keresztül teheti meg [35]. Feltehetőleg ez a biokémiai összefonódás az oka annak, hogy a kezelőszerek hasonló mintázati eltéréseket okoztak a metilomban a metiláció irányultságának, valamint az érintett útvonalaknak és genomiális régióknak a tekintetében. A SAM-kezelés esetében azonban a változó metilációt mutató gének száma lényegesen nagyobb volt, mint amit a folsav használatával mértünk. A tapasztalt párhuzamok miatt a két molekula DNS-metilációra kifejtett hatását az alábbiakban egyidejűleg ismertetjük.

Kezeléstől függetlenül megfigyeltük, hogy CIMP-státuszukkal összefüggésben a HT-29 sejtek magasabb globális DNS-metilációs szinttel rendelkeztek, mint az SW480 sejtvonal. Érdekes módon azonban ez az érték nem változott meg számottevően folsav- és SAM-pótlást követően, hasonlóan Stempak és munkatársai HCT116 és Caco-2 CRC sejtvonalakon végzett folsavas vizsgálataihoz [187]. Felvetődik tehát a kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy a metildonorpótlás látszólag nem befolyásolja a DNS-metiláció szintjét. Ezen ellentmondás tanulmányozására genomszintű vizsgálatot végeztünk RRBS módszer használatával. Azt tapasztaltuk, hogy mind a folsav, mind a SAM adása közel egyenlő mértékben okozott hiper- és hipometilációt egy sejtvonalon belül. Így habár nagyszámú metilációs változás történt a kezelések hatására, az érintett gének száma kiegyenlítette egymást. A másik fontos kérdés, hogy miért nem voltak meghatározó többségben a hipermetilációs folyamatok a metildonor molekulák adását követően. Ennek hátterében a SAM már említett metilom modulátor szerepe keresendő, amelyet először

Wang és munkatársai vetettek fel [161]. Ezen elmélet szerint a SAM nem tisztán hipermetiláló, hanem inkább epigenomikai újraprogramozó feladatot tölt be a daganatos sejtekben rövidtávú alkalmazása esetén [161].

Az érintett genomiális régiók szempontjából folsavkezelésnél nem vettünk észre lényeges különbséget a két sejtvonal között, ugyanis más tanulmányokhoz hasonlóan főként a heterokromatin régióban halmozódtak fel a DMS-ek, amit a gének kifejeződése szempontjából fontos promóter régiók követtek [188,189]. A SAM-kezelés azonban ettől eltérő képet adott, továbbá különbözött a két sejtvonal esetén is. Míg a HT-29 sejtekben a DMS-ek dominánsan a heterokromatin, majd a represszor és promóter szakaszokon dúsultak fel, az SW480 sejteknél főként a promóter, majd a heterokromatin régiókra estek.

A KEGG útvonalelemzés kimutatta, hogy a karcinogenezishez szorosan kötődő folyamatokat (PI3K-Akt [190], MAPK [191], RAP1 [192], aktin citoskeleton szabályozás [193]) érintették leginkább a DNS-metilációs változások mindkét kezelőszer és sejtvonal esetén. Eredményeink tehát megerősítették azokat a kutatásokat, amelyek a SAM szelektív, daganatprogressziót gátló hatásairól számoltak be [158,161]. A SAM a tumorsejtekben ugyanis elősegítheti a genomiális hipermetilációt, elcsendesítheti a protoonkogéneket és aktiválhatja a tumorszuppresszor géneket [162,163,165]. Ez utóbbit támasztotta alá a BeadChip vizsgálatunk is, amelyben arra a top 10 hipo- és hipermetilálódó promóter szakaszra fókuszáltunk, amelyek SAM-kezelést követően a legnagyobb metilációs változást mutatták. Ezek közül néhány gén (*DTX1* [194], *GATA4* [195], *HAAO* [196], *SEZ6L* [197], *TAL1* [198] és *TP53INP1* [199]) SAM által indukált csökkent metilációja rendkívül előnyösnek mutatkozott, ugyanis hipermetilációjukat összefüggésbe hozták korábban a tumorprogresszióval.

6.4. A folsav- és SAM-kezelés hatása a génexpresszióra

A promóter szakaszok metilációs státusza kiemelt jelentőséggel bír a génexpresszió szempontjából, ezért tanulmányunkat genomszintű transzkriptomikai vizsgálattal egészítettük ki [178].

Megfigyeltük, hogy 10.000 ng/mL folsavpótlás hatására mindkét sejtvonalban a

csökkenő expresszióval jellemezhető transzkriptumok száma került túlsúlyba. Az SW480 sejtek esetében nem csak a változások száma és kiterjedtsége, hanem a módosult kifejeződést mutató gének által kódolt fehérjék kapcsolatrendszere is lényegesen nagyobb volt, mint a HT-29 sejtvonalban. A top 10 emelkedett és csökkent expressziós különbséggel rendelkező gének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy közülük három (*CCL2* [200], *HES1* [201] és *STAT3* [202]) meghatározó szerepet játszik a DNS-hibajavításban. Míg a *HES1*-nek és *STAT3*-nak nőtt az expressziója a HT-29 sejtekben, a *CCL2*-t a folsavkezelés elcsendesítette az SW480 mintákban. Ez a transzkriptomikai különbség magyarázattal szolgálhat a sejtvonalak között tapasztalt eltérő hibajavítási készségre.

A szuprafiziológiás folsavkezelés nem okozott szignifikáns transzkriptomikai változásokat egyik ismert biokémiai folyamatban sem. Fehérje-fehérje-kölcsönhatási vizsgálatokkal azonban megállapítottuk, hogy a HT-29 sejtekben a *YWHAZ*, az SW480 sejtekben pedig a citokinkódoló *TNF* voltak a hálózat kulcsfehérjéit expresszáló gének, amelyek mindketten szignifikáns ($p \leq 0,05$) expressziós csökkenést mutattak a folsavpótlás hatására. A *YWHAZ* egy onkogén, amely összefüggésben áll a korábban említett ERK és PI3K-Akt útvonalakkal. Képes elősegíteni a sejtosztódást, migrációt és áttétképzést számos daganat esetén, így gátlása klinikai szempontból is előnyös, valamint megmagyarázhatja a HT-29 sejtek folsavkezelést követő alacsonyabb proliferációs rátáját az SW480-hoz képest [203].

Az 1 mmol/L SAM-kezelés a HT-29 sejtekben egyforma mértékben idézett elő emelkedett és csökkent kifejeződést, azonban érdekes módon az SW480 sejtekben jelentős dominanciát mutattak a kritériumaink szerint felülexpresszálódó gének. Figyelembe véve, hogy ennél a mintacsoportnál volt a legjelentősebb a promóter szakaszok érintettsége a metilációs változások által, éppen ellenkező transzkriptomikai változásokat vártunk volna. A SAM alkalmazása a folsavhoz hasonlóan az SW480 sejtekre volt nagyobb hatással. A SAM-kezelés azonban, mind a változó expressziót mutató gének száma, mind a változások mértéke alapján messze felülmúlta a folsav által okozott transzkriptomikai hatásokat.

A 10 legnagyobb expressziós különbséggel jellemzett gén vizsgálata során megállapítottuk, hogy a máj- [204], vese- [204,205] és gyomorkarcinómákban [206]

bizonyítottan tumorsuppresszor hatással bíró *MIR4521*-nek mindkét sejtvonalban nőtt a kifejeződése SAM adását követően. A kezelés hatására a tumorprogresszióban szerepet játszó *KRT19* [207], *NTSR1* [208,209], *RBMX* [210,211], *RPS3* [212,213] és *SNHG8* [214,215] mutatott csökkent expressziót a HT-29 sejtekben. Az SW480 sejtvonalban pedig az *ANO1* [216,217], *CCL2* [218-221], *GXYLT2* [222,223], *NUP210* [224], *PRR11* [225,226] és *TGFB1* [217,227,228] gének elcsendesítésével figyeltük meg a SAM jótékony hatását a daganatos folyamat gátlásával kapcsolatban.

Ismert, hogy a SAM képes szelektíven befolyásolni azokat az útvonalakat, amelyek a tumorsejtet megkülönböztetik az egészségestől [158,161]. Vizsgálataink alátámasztották ezt a tényt, ugyanis a kezelés eredményesen hatott több karcinogenezissel összefüggő mechanizmusra. Ezek közül meghatározó jelentőségű volt a Bakhoun és munkatársai által összeállított EMT/migráció/metasztázis géncsoport, amelyben minden kritériumainknak megfelelő génnek csökkent a kifejeződése SAM hatására [174]. Ezt követően a CRC progressziójában szerepet játszó EMT-génekre fókuszáltunk, amelyek nagy része szintén alacsonyabb expressziót mutatott a kezelést követően. Kiemelten előnyösnek bizonyult az említett két tumorprogressziós útvonal azon génjeinek (*CXCL1* [229], *FN1* [230], *FOXQ1* [231], *ITGB1* [232], *MSN* [233], *TGFB1* [234], *TMPRSS4* [235] és *VIM* [236]) gátlása, amelyek klinikailag is bizonyítottan részt vesznek a tumorok növekedésében. Közülük a *TGFB1* mutatta a legnagyobb expressziós csökkenést, amelyről ismert, hogy míg az egészséges sejtekben védő szereppel bír, az előrehaladott daganatos folyamatokban támogatja a progressziót [217,227,228].

Transzkriptomikai szempontból a SAM-kezelés a karcinogenezis útvonalai mellett a genomiális stabilitás fenntartásáért felelős géneket is jelentősen érintette. A DDR folyamatban részt vevő gének nagy részének csökkent a kifejeződése, amely alól kivételt jelentett a *CHEK1* a HT-29-ben, a *CCND2* és *RAD50* az SW480-ban, valamint a *HUS1* mindkét sejtvonalban. A SAM útvonal a kromatin átrendeződése révén biztosítja a DNS-hibajavítás megfelelő menetét [55]. Ezért a hisztonfehérjéket kódoló, valamint a módosulásukban szerepet játszó gének transzkriptomikai vizsgálatát is elvégeztük. Az SW480 esetében megfigyeltük a hisztonmodifikáló útvonalak aktiválódását, ami ezen sejtvonal eredményesebb hibajavító mechanizmusát magyarázhatja a HT-29-cel szemben.

A páros összehasonlítások (folsav: 0-10.000 ng/mL; SAM: 0-1 mmol/L) során változó gének közül csupán egy, az *SFN* (stratifin) volt érintett mindegyik mintacsoportban. Érdekes módon egyedül a folsavval kezelt SW480 sejtekben nőtt a kifejeződése, a többi kondíció esetén viszont csökkenést tapasztaltunk. Az *SFN*-ről szóló irodalmak nem egységesek. Egyes tanulmányok úgy mutatják be, mint egy p53 és p21 által szabályozott tumorszuppresszor gént, amely képes megállítani a sejtciklust, ezáltal fontos szerepet játszik a hibajavításban [237-239]. Ezzel szemben néhány kutatási eredmény azt bizonyítja, hogy nagyobb mennyiségben expresszálódik tüdő-, petefészek-, máj- és emlődagangsejtekben az egészséges szövetekhez viszonyítva, és emellett elősegíti a tumorok növekedést is [240-243].

6.5. Promótermetilációs és génexpressziós változásokra vonatkozó eredményeink

Következő lépésként összevetettük az RRBS és HTA elemzésekkel kapott eredményeinket, hogy kapcsolatot állíthassunk fel a kezelőszerek promótermetilációs változást előidéző hatása és a génexpressziós eltérések között. A folsavkezelést követően a HT-29 sejtekben 14, az SW480 sejtekben pedig 13 gén promóterének hipo- vagy hipermetilációja volt összefüggésben emelkedett vagy csökkent kifejeződésével. Ez a szám viszonylag alacsony az összes vizsgált transzkriptomhoz képest, ezért valószínűsítjük, hogy a folsav elsődlegesen nem a promóterre hatva fejt ki génszabályozó képességét. Price és munkatársai felvetése alapján ennek háttérben egyéb mechanizmusok pl. hisztonmetiláció is állhatnak [244].

Eredményeink azt bizonyították, hogy SAM alkalmazása mellett lényegesen nagyobb hatással volt a kezelés által megvalósuló promótermetilációs változás a génexpresszióra, mint amit a folsavnál tapasztaltunk. Ilyen irányú korrelációt ugyanis a HT-29 sejtekben 295, az SW480 sejtekben pedig 420 gén esetében detektáltunk. Ezt a jelenséget önmagában megmagyarázhatná az a tény, hogy a SAM lényegesen nagyobb mértékű metilációs és expressziós változásokat okozott, mint a folsav. Azonban hangsúlyozandó, hogy a két folyamatban érintett gének számának egymáshoz viszonyított aránya szintén a SAM-kezelés esetében volt magasabb. Emellett a korábban ismertetett EMT/migráció/metasztázis, CRC-hez köthető EMT és genomiális instabilitás útvonalak génjeinek is meghatározó hányada (HT-29: 8 gén; SW480: 14 gén) mutatott összefüggést

promótermetilációs státusza és kifejeződésének mértéke között. Figyelembe véve, hogy számos gén esetében ez a korreláció nem állt fenn, azt feltételezzük, hogy a metilom modulálása mellett a folsavhoz hasonlóan a SAM is képes egyéb mechanizmusok által befolyásolni a génexpressziót. Ezt a felvetést Mahmood és munkatársai, valamint Schmidt és munkatársai is leírták emlő- és prosztatarák sejteken végzett kísérleteik kapcsán [163,245].

6.6. A sejtvonalak mutációs profilja az onkogének és az 1C metabolizmus génjeinek vonatkozásában

Végezetül meghatároztuk a két sejtvonal mutációs profilját az onkogének és az 1C metabolizmusban érintett gének vonatkozásában teljesexom-szekvenálás segítségével. A CIN útvonal elsőként inaktiválódó génje, az *APC* a HT-29 és az SW480 sejtvonalban is mutálódott [63]. A daganatos progresszió további lépéseire jellemző *TP53* mutációt mindkét sejtvonalban megfigyeltük, azonban csak a HT-29 sejtek hordoztak *BRAF*, *EGFR*, *PIK3CA* és *SMAD4* mutációt, és *KRAS*, valamint *MSH6* érintettséget csupán az SW480-ban sikerült leírnunk [63,72,91]. Az 1C ciklus génjeinek szekvenálásával a HT-29 sejtekben heterozigótást állapítottunk meg az *MTHFR* gén C677T és A1298C variánsára, ami potenciálisan az enzim működésének 40-50%-os csökkenését eredményezheti [121]. Ezzel szemben az SW480 sejtek a C677T variánsra bizonyultak homozigótának, amely 50-60%-kal alacsonyabb enzim aktivitáshoz is vezethet a vad típushoz képest [26]. Emellett kimutattuk, hogy a *DNMT1* csak az SW480 sejtekben, azonban a *DNMT3b* mindkét sejtvonalban mutált volt. Megfigyelhető tehát, hogy az *MTHFR*, *DNMT1* és *DNMT3b* gének mutációs érintettsége az SW480 sejtek esetében meghatározóbb volt a HT-29-hez viszonyítva. Ez a különbség feltételezéseink szerint szoros összefüggésben áll a két sejtvonal között tapasztalható eltérő globális DNS-metilációs értékekkel, és ezáltal a CIMP-státuszukkal.

6.7. Legfontosabb új megállapítások

1. A folsav fiziológiás koncentrációban (100 ng/mL) növeli a HT-29 sejtek proliferációját és viabilitását, a folsavmegvonáshoz (0 ng/mL), valamint a 10.000 ng/mL folsavpótláshoz képest. Ellenben a folsavkezelés az SW480 mintákra ilyen téren nincs hatással, és a két sejtvonal sejtciklusát sem befolyásolja.

- A SAM koncentrációarányosan csökkenti mindkét sejtvonal osztódását és emellett S-fázis-megállást idéz elő. A sejtek viabilitása azonban nem változik SAM-adás hatására.
2. A HT-29 sejtek alapvetően magasabb DNS-integritási értékkel rendelkeznek, mint az SW480 sejtvonal. A folsav pótlása a HT-29, míg a SAM-kezelés az SW480 sejtek genomiális stabilitását növeli meg nagyobb mértékben.
 3. CIMP-státuszukkal összefüggésben a HT-29 sejtek nagyobb globális DNS-metilációs szintet mutatnak, mint az SW480 sejtvonal. Bár ezekre az átlagértékekre a folsav- és a SAM-kezelés nincs szignifikáns hatással, mégis nagyszámú metilációs változás történik a genomban, amely megközelítőleg azonos mennyiségű hipo- és hipermetilációt foglal magában. A kezelőszerek hasonló módon befolyásolják a metilomot, tehát mindkét molekula elsősorban a heterokromatin és promóter régiókra hat, valamint főként a karcinogenezishez kapcsolható útvonalakban eredményez epigenetikai újraprogramozást.
 4. A folsav és a SAM adása figyelemre méltó génexpressziós eltérésekhez vezet, amelyek összefüggésbe hozhatók a sejtek kezelést követően detektált proliferációs és hibajavítási aktivitásával. Míg ezen folyamatokat érintően a folsav néhány gén (pl. *HES1*, *STAT3* és *YWHAZ*) transzkripcióját változtatja meg, a SAM képes teljes útvonalak gátlására (EMT/migráció/metasztázis) vagy aktiválására (hiszton módosulás).
 5. A SAM a DNS-metiláció és a génexpresszió tekintetében is lényegesen nagyobb mértékű módosulásokat képes előidézni, mint a folsav. Habár a kezeléseket követően számos gén promótermetilációs státusza összefüggésbe hozható kifejeződésének szintjével, a génexpressziós változások háttérében egyéb folsavhoz és SAM-hoz köthető hatásokat (pl. hisztonmetiláció) is valószínűsítünk.
 6. Az onkogének (pl. *BRAF* és *KRAS*) és az 1C ciklus génjeinek (pl. *MTHFR*, *DNMT1*, *DNMT3b*) tekintetében a HT-29 és SW480 sejtek mutációs profilja számos különbséget mutat, amelyek hozzájárulnak a sejtvonalak kezelésekre adott eltérő válaszához.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD-munkám során két metildonor szerepet betöltő molekula, a folsav és a SAM önálló, valamint egymáshoz viszonyított hatását vizsgáltam különböző genetikai és epigenetikai háttérrel rendelkező vastagbélrák sejtvonalakban (HT-29 és SW480). A kapott adatok nagy részét alátámasztották a molekulákkal kapcsolatos eddigi ismereteink és a korábbi tanulmányok, azonban számos új eredménnyel sikerült bővítenünk ezt a tudományterületet.

Kutatásunk alatt megfigyeltük, hogy a folsav a DNS-szintézisben és -metilációban betöltött kettős szerepéből kifolyólag változatosan hatott a sejtek működésére. Ellenben a SAM igazolt antitumor hatásainak köszönhetően kiszámíthatóan és eredményesen szorította vissza a karcinogenezissel összefüggő folyamatokat.

A folsav a biokémiai alapmechanizmusokat tekintve nem befolyásolta szignifikánsan az SW480 sejteket, azonban hatott a HT-29 sejtvonal osztódási aktivitására és életképességére, emellett növelte ezen sejtvonal genomiális stabilitását. A SAM adása ezzel szemben mindkét sejtípus esetében mérsékelte a proliferációt és S-fázis-megálláshoz vezetett, ugyanakkor főként az SW480 sejtekben idézett elő jól detektálható javulást a genom integritásában. A két sejtvonal között tapasztalt különböző válaszokat az eltérő génexpressziós változásokkal magyarázhatjuk. A folsavkezelés ugyanis a HT-29 sejtekben csökkentette a proliferációban szerepet játszó *YWHAZ* génhez köthető útvonalak aktivitását és növelte a hibajavítás génjeinek (*HES1*, *STAT3*) kifejeződését az SW480-nal szemben. A SAM ugyanakkor mindkét sejtvonalban mérsékelte a tumorprogressziós útvonalak transzkripcióját, valamint aktiválta a hibajavításhoz szükséges kromoszómaátrendeződés génjeit az SW480 sejtekben.

A folsav a SAM prekursor molekulájának tekinthető a DNS-metilációs folyamatokban. Feltételezéseink szerint ez a fennálló biokémiai kapcsolatrendszer vezetett a kezelőszerek hasonló, a SAM-mal korábban már összefüggésbe hozott, metilommodifikáló hatásához. Használatuk ugyanis elsősorban a karcinogenezis útvonalaiban eredményezett epigenetikai újraprogramozást, amely során a hipo- és hipermetilációs változások

szintjében viszonylagos egyensúlyt tapasztaltunk. Bár a kezelést követően összefüggéseket találtunk a promóter szakaszok metilációs státusza és a transzkripció esetleges növekedése vagy csökkenése között, mégis azt valószínűsítjük, hogy egyéb folsav és SAM által előidézett mechanizmusok (pl. hisztonmetiláció) is szerepet játszottak a génexpresszió szabályozásában.

Exomszekvenálási adataink rávilágítottak arra, hogy nem csupán az onkogének, de az 1C ciklus génjeinek mutációs profilját illetően is lényeges különbségek voltak a sejtvonalak között, amelyek potenciálisan befolyásolhatják a metildonor molekulák felhasználását. Ez vezethetett ahhoz, hogy a HT-29 és SW480 sejtek eltérően reagáltak az alkalmazott kezelőszerekre.

A folsavat évtizedek óta széles körben alkalmazzák az onkológiai ellátásban kemoterápiás kezelések segédmolekulájaként. A SAM pedig, az általa előidézett előnyös hatásokból kifolyólag, nagy valószínűséggel a daganatos betegek terápiájának része lesz a közeljövőben. A sejtvonalak különböző reakciója a metildonorokra felhívja a figyelmet a tumor heterogenitás jelentőségére. Ezért a személyre szabott orvoslás térhódításával érdemes lenne előzetes molekuláris diagnosztikai vizsgálatokkal a betegek folsav- és SAM-kezelésre adott válaszána felmérése a hatásos terápiás kimenetel szempontjából.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A globális DNS-metiláció szintjének csökkenése és a promóterspecifikus hipermetiláció a vastagbélrákok jellegzetes epigenetikai sajátossága. Amellett, hogy hozzájárulnak a genomiális instabilitáshoz és az onkogének fokozott expressziójához, a tumorszuppresszor géneket is elcsendesíthetik. Ezen jelenségek esetleges visszafordíthatósága ösztönzött minket arra, hogy a gyógyászatban széleskörűen alkalmazott metildonor molekulák, azaz a folsav és a SAM, rövidtávú hatását vizsgáljuk HT-29 és SW480 vastagbélrák sejtvonalakon. A DNS-metilációban betöltött szerepén túl a folsav a DNS-szintézisben is elengedhetetlen, a SAM pedig számos biokémiai folyamat prekursora. Így egy olyan kísérletsorozatot terveztünk, amely lehetővé tette a kezelőszerek által előidézett változások átfogó vizsgálatát modern molekuláris biológiai technikák használatával. A folsav a sejtbiológiai alapfolyamatokat tekintve inkább a HT-29 sejtekre volt hatással, amelyek közül a proliferációt és viabilitást fiziológiás koncentrációban növelte, a genomiális instabilitást pedig mindkét alkalmazott dózisban csökkentette. Ezzel szemben a SAM lelassította a két sejtvonal osztódási ütemét és megállította a sejtciklust S-fázisban, a genom integritását viszont főként az SW480 sejtekben növelte. Biokémiai kapcsolataikból kifolyólag a kezelőszerek hasonló DNS-metilációs változásokat eredményeztek, ugyanis közel egyforma mértékben okoztak hipo- és hipermetilációt, ami főként a heterokromatin és promóter régiókat érintette. Emellett megfigyeltük, hogy elsősorban a karcinogenezishez köthető útvonalakban idéztek elő epigenetikai újraprogramozást. A kezeléseket követő transzkriptomikai módosulások összefüggésben voltak a sejtproliferációs és genomintegritásra vonatkozó eredményeinkkel. A SAM esetében ez az expressziós változás kiemelkedő volt, ugyanis mindkét sejtvonalban gátolta a tumorprogresszióban szerepet játszó útvonalakat. A gének kifejeződését a kezelőszerek a promótermetiláción túl egyéb folyamatokon keresztül is szabályozták. A két sejtvonal eltérően reagált a metildonorokra, aminek háttérében nagy valószínűséggel különböző mutációs profiljuk áll. A kapott adataink alátámasztják a folsav, és támogatják a SAM létjogosultságát a daganatok metilom módosítás által történő kezelésében. Azonban az eredményes terápiás kimenetel érdekében érdemes figyelembe venni az általunk is tapasztalt tumor heterogenitás jelentőségét.

9. SUMMARY

Global DNA hypomethylation and promoter-specific hypermethylation are characteristic features of colorectal cancer. Along with genomic instability, the increased expression of oncogenes and silencing of tumor suppressors can also be attributed to them. The potential reversibility of these processes encouraged us to detect the short-term effects of two methyl donor molecules widely used as therapeutics (i.e., folic acid and SAM) on HT-29 and SW480 colorectal cancer cell lines. Besides being involved in DNA methylation, folic acid is essential for nucleotide synthesis, while SAM is the precursor of multiple biochemical reactions. Therefore, we designed a series of experiments that enabled us to comprehensively analyze the treatment-induced alterations using modern molecular biological techniques. Considering the cellular maintenance processes, mainly HT-29 cells were influenced by folic acid treatment. Its physiological dose caused elevated proliferation and viability levels in this cell line; moreover, it increased genomic stability in both concentrations. However, SAM reduced the proliferation rate and induced S phase arrest in the applied cell lines, but it primarily promoted the genome integrity of SW480 cells. The treatments resulted in similar DNA methylation changes due to the biochemical link between folic acid and SAM. Consequently, we observed that both molecules caused hypo- and hypermethylation in a relatively equal proportion that was mainly located in the heterochromatin and promoter regions. Additionally, this epigenetic reprogramming dominantly affected pathways related to carcinogenesis. The treatment-induced transcriptomic changes were in conjunction with the detected cell proliferation and genome integrity results. The expression alterations were particularly spectacular in the case of SAM, as this molecule could efficiently inhibit the tumor progression-related pathways. We also hypothesized that the treatments regulated gene expression through variable processes other than promoter methylation. The two cell lines responded differently to the methyl donors, which could be referred to their individual mutational patterns. Our results undeniably support the application of folic acid and SAM in cancer treatment through methylome modification; however, the recognized tumor heterogeneity is worth considering in order to achieve a successful therapeutic outcome.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jin Z, Liu Y. (2018) DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*, 5: 1-8.
2. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128: 635-638.
3. Tronick E, Hunter RG. (2006) Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav Neurosci*, 10: 107.
4. Weinhold B. (2006) Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*, 114: A160-A167.
5. Moore LD, Le T, Fan G. (2012) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38: 23-38.
6. Jiang S, Guo Y. (2020) Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. *Stem Cells Int*, 2020: 1047896.
7. Pal S, Tyler JK. (2016) Epigenetics and aging. *Sci Adv*, 2: e1600584.
8. Reik W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447: 425-432.
9. Gibney ER, Nolan CM. (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105: 4-13.
10. Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. (2016) Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*, 20: 246-258.
11. Hochedlinger K, Plath K. (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136: 509-523.
12. Remely M, Stefanska B, Lovrecic L, Magnet U, Haslberger AG. (2015) Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18: 328-333.
13. Gerhauser C. (2013) Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Top Curr Chem*, 329: 73-132.
14. Das PM, Singal R. (2004) DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 22: 4632-4642.
15. Kulis M, Esteller M. (2010) DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 70: 27-56.
16. Mahmoud AM, Ali MM. (2019) Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients*, 11: 608.

17. Zsigrai S, Kalmár A, Valcz G, Szigeti KA, Barták BK, Nagy ZB, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2019) A B9-vitamin élettani és kórélettani jelentősége. Összegzés a folsav táplálékkiegészítőként történő alkalmazásának 30. évfordulójára. *Orv Hetil*, 160: 1087-1096.
18. Kuo LJ, Yang LX. (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22: 305-309.
19. Yang X, Shao X, Gao L, Zhang S. (2016) Comparative DNA methylation analysis to decipher common and cell type-specific patterns among multiple cell types. *Brief Funct Genomics*, 15: 399-407.
20. Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2018) A DNS-metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során. *Orv Hetil*, 159: 3-15.
21. Yao Y, Dai W. (2014) Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen*, 5: 1000165.
22. Riddle NC. (2017) The role of epigenetics in maintaining genome stability. *The Biochemist*, 39: 12-15.
23. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. (2012) Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*, 3: 21-38.
24. Niculescu MD, Zeisel SH. (2002) Diet, Methyl Donors and DNA Methylation: Interactions between Dietary Folate, Methionine and Choline. *J Nutr*, 132: 2333S-2335S.
25. Lu SC. S-Adenosylmethionine. (2000) *Int J Biochem Cell Biol*, 32: 391-395.
26. Marosi K, Agota A, Végh V, Joó JG, Langmár Z, Kriszbacher I, Nagy ZB. (2012) A homocisztein és a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, metionin-szintáz, valamint a metionin-szintáz-reduktáz génpolimorfizmusok szerepe a cardiovascularis megbetegedésekben és a magas vérnyomás kialakulásában. *Orv Hetil*, 153: 445-453.
27. Wilmanns W, Sauer H, Schalhorn A. (1980) Biochemical control of high-dose methotrexate/Leucovorin rescue therapy. *Recent Results Cancer Res*, 74: 42-49.
28. Greenberg MVC, Bourc'his D. (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 590-607.
29. Curtis J. (2017) Nutriepigenomics advances into personalized nutrition. *Biomed J Sci Tech Res*, 1: 273-280.

30. Kordella C, Lamprianidou E, Kotsianidis I. (2021) Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter. *Front Oncol*, 11: 650473.
31. Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD. (2008) DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*, 28: 752-771.
32. Stein RA, Davis DL. (2012) Epigenetics: A Fascinating Field with Profound Research, Clinical, & Public Health Implications. *The American Biology Teacher*, 74: 213-223.
33. Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A, Fraga MF. (2010) Epigenetics and environment: a complex relationship. *J Appl Physiol*, 109: 243-251.
34. Biswas S, Rao CM. (2017) Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther*, 173: 118–134.
35. Kim YI. (2016) Current Status of Folic Acid Supplementation on Colorectal Cancer Prevention. *Curr Pharmacol Rep*, 2: 21-33.
36. Goh YI, Koren G. (2008) Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *J Obstet Gynaecol*, 28: 3-13.
37. Gören JL, Stoll AL, Damico KE, Sarmiento IA, Cohen BM. (2004) Bioavailability and lack of toxicity of S-adenosyl-L-methionine (SAME) in humans. *Pharmacotherapy*, 24: 1501-1507.
38. Ross SA. (2003) Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 983: 197-207.
39. Ghazi T, Arumugam T, Foolchand A, Chuturgoon AA. (2020) The Impact of Natural Dietary Compounds and Food-Borne Mycotoxins on DNA Methylation and Cancer. *Cells*, 9: 2004.
40. de Conti A, Pogribny IP. Epigenetics of Dietary Methyl-Group Donor Deficiency and Liver Cancer. In: Patel V, Preedy V (szerk.), *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*. Springer, Cham, 2019: 1023-1038.
41. Maugeri A, Barchitta M. (2020) How Dietary Factors Affect DNA Methylation: Lesson from Epidemiological Studies. *Medicina*, 56: 374.
42. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and

reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*, 63: 7563-7570.

43. Khan MA, Hussain A, Sundaram MK, Alalami U, Gunasekera D, Ramesh L, Hamza A, Quraishi U. (2015) (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncol Rep*, 33: 1976-1984.
44. Xie Q, Bai Q, Zou LY, Zhang QY, Zhou Y, Chang H, Chang H, Yi L, Zhu JD, Mi MT. (2014) Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 53: 422-431.
45. Tian Q, Zhao J, Yang Q, Wang B, Deavila JM, Zhu MJ, Du M. (2020) Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. *Aging Cell*, 19: e13059.
46. Johanning GL, Heimbürger DC, Piyathilake CJ. (2002) DNA Methylation and Diet in Cancer. *J Nutr*, 132: 3814S-3818S.
47. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Khushal A, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. (2005) Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. *Gut*, 54: 648-653.
48. Teschendorff AE, West J, Beck S. (2013) Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum Mol Genet*, 22: R7-R15.
49. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. (2013) The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 6: 120-128.
50. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, Christensen BC, Gladyshev VN, Heijmans BT, Horvath S, Ideker T, Issa JJ, Kelsey KT, Marioni RE, Reik W, Relton CL, Schalkwyk LC, Teschendorff AE, Wagner W, Zhang K, Rakyan VK. (2019) DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol*, 20: 249.
51. Xiao FH, Wang HT, Kong QP. (2019) Dynamic DNA Methylation During Aging: A “Prophet” of Age-Related Outcomes. *Front Genet*, 10: 107.
52. Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14: R115.
53. Gautrey HE, van Otterdijk SD, Cordell HJ, Newcastle 85+ Study Core Team, Mathers JC, Strathdee G. (2014) DNA methylation abnormalities at gene

promoters are extensive and variable in the elderly and phenocopy cancer cells. *FASEB J*, 28: 3261-3272.

54. Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Bodor A, Tóth K, Patai ÁV, Valcz G, Nagy ZB, Kubák V, Tulassay Z, Kovalszky I, Molnár B. (2015) DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BMC Cancer*, 15: 736.
55. García Fernández F, Fabre E. (2022) The Dynamic Behavior of Chromatin in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Genes*, 13: 215.
56. Jackson SP, Bartek J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461: 1071-1078.
57. Weber AM, Ryan AJ. (2015) ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*, 149: 124-138.
58. Shen Z. (2011) Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol*, 3: 1-3.
59. Laffon B, Bonassi S, Costa S, Valdiglesias V. (2021) Genomic instability as a main driving factor of unsuccessful ageing: Potential for translating the use of micronuclei into clinical practice. *Mutat Res - Rev Mut Res*, 787: 108359.
60. Yusoh NA, Ahmad H, Gill MR. (2020) Combining PARP Inhibition with Platinum, Ruthenium or Gold Complexes for Cancer Therapy. *ChemMedChem*, 15: 2121-2135.
61. Collins PL, Purman C, Porter SI, Nganga V, Saini A, Hayer KE, Gurewitz GL, Sleckman BP, Bednarski JJ, Bassing CH, Oltz EM. (2020) DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nat Commun*, 11: 1-9.
62. Scully R, Xie A. (2013) Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res*, 750: 5-14.
63. Pino MS, Chung DC. (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138: 2059-2072.
64. Bielski CM, Taylor BS. (2021) Homing in on genomic instability as a therapeutic target in cancer. *Nat Commun*, 12: 3663.
65. Lepage CC, Morden CR, Palmer MCL, Nachtigal MW, McManus KJ. (2019) Detecting Chromosome Instability in Cancer: Approaches to Resolve Cell-to-Cell Heterogeneity. *Cancers*, 11: 226.

66. Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. (2008) Defining “chromosomal instability.” *Trends Genet*, 24: 64-69.
67. Bakhoun SF, Swanton C. (2014) Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer. *Front Oncol*, 4: 161.
68. Hoevenaar WHM, Janssen A, Quirindongo AI, Ma H, Klaasen SJ, Teixeira A, van Gerwen B, Lansu N, Morsink FHM, Offerhaus GJA, Medema RH, Kops GJPL, Jelluma N. (2020) Degree and site of chromosomal instability define its oncogenic potential. *Nat Commun*, 11: 1501.
69. Boland CR, Goel A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138: 2073-2087.e3.
70. Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol*, 29: 294-307.
71. Yamamoto H, Imai K. (2015) Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*, 89: 899-921.
72. Bogaert J, Prenen H. (2014) Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Hepatol*, 27: 9-14.
73. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. (2020) Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*, 20: 16.
74. Issa JP. (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4: 988-993.
75. Fedorova MS, Krasnov GS, Lukyanova EN, Zaretsky AR, Dmitriev AA, Melnikova NV, Moskalev AA, Kharitonov SL, Pudova EA, Guvatova ZG, Kobelyatskaya AA, Ishina IA, Slavnova EN, Lipatova AV, Chernichenko MA, Sidorov DV, Popov AY, Kiseleva MV, Kaprin AD, Snezhkina AV, Kudryavtseva AV. (2019) The CIMP-high phenotype is associated with energy metabolism alterations in colon adenocarcinoma. *BMC Med Genet*. 20: 52.
76. Samanta S, Dey P. (2012) Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol*, 40: 84-90.
77. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. (2013) Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet*, 4: 131.
78. Terradas M, Martín M, Genescà A. (2016) Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Arch Toxicol*, 90: 2657-2667.

79. Bonassi S, Ceppi M, Møller P, Azqueta A, Milić M, Neri M, Brunborg G, Godschalk R, Koppen G, Langie SAS, Teixeira JP, Bruzzone M, Da Silva J, Benedetti D, Cavallo D, Ursini CL, Giovannelli L, Moretti S, Riso P, Del Bo' C, Russo P, Dobrzyńska M, Goroshinskaya IA, Surikova EI, Staruchova M, Barančokova M, Volkovova K, Kažimirova A, Smolkova B, Laffon B, Valdiglesias V, Pastor S, Marcos R, Hernández A, Gajski G, Spremo-Potparević B, Živković L, Boutet-Robinet E, Perdry H, Lebailly P, Perez CL, Basaran N, Nemeth Z, Safar A, Dusinska M, Collins A; hCOMET project. (2021) DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci Rep*, 11: 16793.
80. Olive PL, Banáth JP. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in Individual cells. *Nat Protoc*, 1: 23-29.
81. Global cancer statistics 2018. (2020) GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 70: 313.
82. Who Classification of Tumours Editorial Board. (2019) Digestive System Tumours. Who Press.
83. Kastrinos F, Syngal S. (2011) Inherited Colorectal Cancer Syndromes. *Cancer J*, 17: 405-415.
84. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*, 67: 93-99.
85. Nguyen HT, Duong HQ. (2018) The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett*, 16: 9-18.
86. Barták BK, Fodor T, Kalmár A, Nagy ZB, Zsigrai S, Szigeti KA, Valcz G, Igaz P, Dank 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: 3774.
87. Barták BK, Kalmár A, Péterfia B, Patai ÁV, Galamb O, Valcz G, Spisák S, Wichmann B, Nagy ZB, Tóth K, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2017) Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics*, 12: 751-763.
88. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IM, Vogelstein B, Lengauer C. (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 16226-16231.

89. Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, Cuatrecasas M, Bujanda L, Giraldez MD, Takahashi M, Cabanne A, Barugel ME, Arnold M, Roca EL, Andreu M, Castellvi-Bel S, Llor X, Jover R, Castells A, Boland CR, Goel A. (2012) A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One*, 7: e45357.
90. De Rosa M, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Niglio A, Izzo P, Pace U, Delrio P. (2016) The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Therap Adv Gastroenterol*, 9: 861-886.
91. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. (2005) The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, 54: 1283-1286.
92. Tarafa G, Villanueva A, Farré L, Rodríguez J, Musulén E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capellá G. (2000) DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene*, 19: 546-555.
93. Thomas KM. (2012) Gene Expression Profiling of Colorectal Tissues in the Early Adenoma-carcinoma Sequence, University of Leicester (tézis).
94. Markle B, May EJ, Majumdar APN. (2010) Do nutraceuticals play a role in the prevention and treatment of colorectal cancer? *Cancer Metastasis Rev*, 29: 395-404.
95. Jass JR. (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50: 113-130.
96. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*, 2011: 902674.
97. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. (2016) Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469: 125-134.
98. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. (2020) Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*, 22: 130.
99. Maffeis V, Nicolè L, Cappellesso R. (2019) RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 9: 1255.
100. Okita A, Takahashi S, Ouchi K, Inoue M, Watanabe M, Endo M, Honda H, Yamada Y, Ishioka C. (2018) Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 9: 18698-18711.

101. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. (2019) Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep*, 21: 5.
102. Chowdhury S, Hofree M, Lin K, Maru D, Kopetz S, Shen JP. (2021) Implications of Intratumor Heterogeneity on Consensus Molecular Subtype (CMS) in Colorectal Cancer. *Cancers*, 30: 4923.
103. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 21: 1350-1356.
104. Coebergh van den Braak RRJ, ten Hoorn S, Sieuwerts AM, Tuynman JB, Smid M, Wilting SM, Martens JWM, Punt CJA, Foekens JA, Medema JP, IJzermans JNM, Vermeulen L. (2020) Interconnectivity between molecular subtypes and tumor stage in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 20: 1-7.
105. Finkelstein JD, Martin JJ. (2000) Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: 385-389.
106. Sagar NA, Tarafdar S, Agarwal S, Tarafdar A, Sharma S. (2021) Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management. *Med Sci*, 9: 44.
107. Baggott JE, Tamura T. (2015) Folate-Dependent Purine Nucleotide Biosynthesis in Humans. *Adv Nutr*, 6: 564-571.
108. Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, Fedorova O, Vasileva E, Barlev NA. (2017) One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget*, 8: 23955-23977.
109. Hardy LW, Finer-Moore JS, Montfort WR, Jones MO, Santi DV, Stroud RM. (1987) Atomic Structure of Thymidylate Synthase: Target for Rational Drug Design. *Science*, 235: 448-455.
110. Bhargava S, Ali A, Bhargava EK, Manocha A, Kankra M, Das S, Mohan Srivastava L. (2012) Lowering homocysteine and modifying nutritional status with folic acid and vitamin B(12) in Indian patients of vascular disease. *J Clin Biochem Nutr*, 50: 222-226.

111. Sanderson SM, Gao X, Dai Z, Locasale JW. (2019) Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer*. 19: 625-637.
112. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. (2011) Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*, 3: 370-384.
113. Castellanos-Sinco HB, Ramos-Peñafiel CO, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Martínez-Murillo C, Montaña-Figueroa E, Sinco-Ángeles A. (2015) Megaloblastic anaemia: Folic acid and vitamin B12 metabolism. *Rev Med Hosp Gen*, 78: 135-143.
114. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academies Press, Washington, 1998: 196-305.
115. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. (2010) Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*, 49: 535-548.
116. Melse-Boonstra A, de Bree A, Verhoef P, Bjørke-Monsen AL, Verschuren WMM. (2002) Dietary monoglutamate and polyglutamate folate are associated with plasma folate concentrations in Dutch men and women aged 20-65 years. *J Nutr*, 132: 1307-1312.
117. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexø E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM. (2004) Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing*, 33: 34-41.
118. Fenech M. (2001) The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, 475: 57-67.
119. Vidmar Golja M, Šmid A, Karas Kuželički N, Trontelj J, Geršak K, Mlinarič-Raščan I. (2020) Folate Insufficiency Due to MTHFR Deficiency Is Bypassed by 5-Methyltetrahydrofolate. *J Clin Med Res*, 9: 2836.
120. Czeizel E, Tímár L, Botto L. (2001) A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) gén polimorfizmusának (C677T) magyarországi gyakorisága. *Orv Hetil*, 142: 1227-1229.
121. Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, Bristow S, Bowles M, Fragouli E, Delhanty J, Wells D. (2016) Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet*, 135: 555-568.

122. Ryan BM, Weir DG. (2001) Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med*, 138: 164-176.
123. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, 13: 225-238.
124. Pufulete M, Emery PW, Sanders TAB. (2003) Folate, DNA methylation and colorectal cancer. *Proc Nutr Soc*, 62: 437-445.
125. Antony AC. Megaloblastic Anemias. In: Goldman L, Schafer AI. (szerk.), *Goldman's Cecil Medicine*. Elsevier W.B. Saunders, Philadelphia, 2012: 1075-1083.
126. Lucock M. (2000) Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Mol Genet Metab*. 71: 121-138.
127. Young SN. (2007) Folate and depression - a neglected problem. *J Psychiatry Neurosci*, 32: 80-82.
128. Czeizel AE. (1993) Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ*, 306: 1645-1648.
129. Hoffbrand AV, Weir DG. (2001) The history of folic acid. *Br J Haematol*, 113: 579-589.
130. Centers for Disease Control and Prevention. (1993) Recommendations for use of folic acid to reduce number of spina bifida cases and other neural tube defects. *JAMA*, 269: 1236-1238.
131. Czeizel AE. (2002) Bread is fortified with folic acid in Hungary. *BMJ*, 325: 391.
132. Jägerstad M. (2012) Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks. *Acta Paediatr*, 101: 1007-1012.
133. Czeizel AE, Merhala Z. (1998) Bread fortification with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 in Hungary. *Lancet*, 352: 1225.
134. Oakley GP, Weber MB, Bell KN, Colditz P. (2004) Scientific evidence supporting folic acid fortification of flour in Australia and New Zealand. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 70: 838-841.
135. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. (2012) Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*, 23: 853-859.

136. Mathers JC. (2005) Reversal of DNA hypomethylation by folic acid supplements: possible role in colorectal cancer prevention. *Gut*, 54: 579-581.
137. French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G. (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther*, 74: 288-294.
138. Kadaveru K, Protiva P, Greenspan EJ, Kim YI, Rosenberg DW. (2012) Dietary methyl donor depletion protects against intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *Cancer Prev Res*, 5: 911-920.
139. Farias N, Ho N, Butler S, Delaney L, Morrison J, Shahrzad S, Coomber BL. (2015) The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. *J Nutr Biochem*, 26: 818-826.
140. Kim YI. (2004) Folate and DNA Methylation: A Mechanistic Link between Folate Deficiency and Colorectal Cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13: 511-519.
141. 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: 605.
142. Ulrich CM, Potter JD. (2006) Folate supplementation: too much of a good thing? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 189-193.
143. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Riboli E. (1999) Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer*, 79: 1917-1921.
144. Gonen N, Assaraf YG. (2012) Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat*, 15: 183-210.
145. Spain PD, Kadan-Lottick N. (2012) Observations of unprecedented remissions following novel treatment for acute leukemia in children in 1948. *J R Soc Med*, 105: 177-181.
146. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. (2012) The antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am*, 26: 629-48, ix.
147. Howard SC, McCormick J, Pui C-H, Buddington RK, Donald Harvey R. (2016) Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist*. 21: 1471-1482.

148. Lakatos L, Lakatos PL. (2005) A colorectalis daganatok korszerű kezelése. *Lege Artis Med*, 15: 177-186.
149. Longley DB, Paul Harkin D, Johnston PG. (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3: 330-338.
150. Arbuck SG. (1989) Overview of clinical trials using 5-fluorouracil and leucovorin for the treatment of colorectal cancer. *Cancer*, 63: 1036-1044.
151. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci*, 29: 243-249.
152. Markham GD. S-Adenosylmethionine. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Chichester, 2010.
153. Sekowska A, Ashida H, Danchin A. (2019) Revisiting the methionine salvage pathway and its paralogues. *Microb Biotechnol*, 12: 77-97.
154. Markham GD, Norrby PO, Bock CW. (2002) S-adenosylmethionine conformations in solution and in protein complexes: conformational influences of the sulfonium group. *Biochemistry*, 41: 7636-7646.
155. Lieber CS, Packer L. (2002) S-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects - an introduction. *Am J Clin Nutr*, 76: 1148S-1150S.
156. Loenen WAM. (2006) S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem Soc Trans*, 34: 330-333.
157. Friedel HA, Goa KL, Benfield P. (1989) S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs*, 38: 389-416.
158. Parashar S, Cheishvili D, Arakelian A, Hussain Z, Tanvir I, Khan HA, Szyf M, Rabbani SA. (2015) S-adenosylmethionine blocks osteosarcoma cells proliferation and invasion in vitro and tumor metastasis in vivo: therapeutic and diagnostic clinical applications. *Cancer Med*, 4: 732-744.
159. Noureddin M, Sander-Struckmeier S, Mato JM. (2020) Early treatment efficacy of S-adenosylmethionine in patients with intrahepatic cholestasis: A systematic review. *World J Hepatol*, 12: 46-63.
160. Soeken KL, Lee WL, Bausell RB, Agelli M, Berman BM. (2002) Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis. *J Fam Pract*, 51: 425-430.

161. Wang Y, Sun Z, Szyf M. (2017) S-adenosyl-methionine (SAM) alters the transcriptome and methylome and specifically blocks growth and invasiveness of liver cancer cells. *Oncotarget*, 8: 111866-111881.
162. Zhao Y, Li JS, Guo MZ, Feng BS, Zhang JP. (2010) Inhibitory effect of S-adenosylmethionine on the growth of human gastric cancer cells in vivo and in vitro. *Chin J Cancer*, 29: 752-760.
163. Schmidt T, Leha A, Salinas-Riester G. (2016) Treatment of prostate cancer cells with S-adenosylmethionine leads to genome-wide alterations in transcription profiles. *Gene*, 595: 161-167.
164. Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA. (2004) Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J Biol Chem*, 279: 31735-31744.
165. Stoyanov E, Mizrahi L, Olam D, Schnitzer-Perlman T, Galun E, Goldenberg DS. (2017) Tumor-suppressive effect of S-adenosylmethionine supplementation in a murine model of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis is dependent on treatment longevity. *Oncotarget*, 8: 104772-104784.
166. Pellis L, Dommels Y, Venema D, van Polanen A, Lips E, Baykus H, Kok F, Kampman E, Keijer J. (2008) High folic acid increases cell turnover and lowers differentiation and iron content in human HT29 colon cancer cells. *Br J Nutr*, 99: 703-708.
167. Li TWH, Zhang Q, Oh P, Xia M, Chen H, Bermanian S, Lastra N, Circ M, Moyer MP, Mato JM, Aw TY, Lu SC. (2009) S-Adenosylmethionine and Methylthioadenosine Inhibit Cellular FLICE Inhibitory Protein Expression and Induce Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Mol Pharmacol*, 76: 192-200.
168. Yang H, Sadda MR, Li M, Zeng Y, Chen L, Bae W, Ou X, Runnegar MT, Mato JM, Lu SC. (2004) S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S). *Hepatology*, 40: 221-231.
169. Valcz G, Buzás EI, Kittel Á, Krenács T, Visnovitz T, Spisák S, Török G, Homolya L, Zsigrai S, Kiszler G, Antalffy G, Pálóczi K, Szállási Z, Szabó V, Sebestyén A, Solymosi N, Kalmár A, Dede K, Lőrincz P, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2019) En bloc release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. *J Extracell Vesicles*, 8: 1596668.
170. Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, Galamb O, Barták BK, Spisák S, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Colorectal adenoma and carcinoma specific miRNA profiles in biopsy and their expression in plasma specimens. *Clin Epigenetics*, 9: 22.

171. Kalmár A, Nagy ZB, Galamb O, Csabai I, Bodor A, Wichmann B, Valcz G, Barták BK, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2019) Genome-wide expression profiling in colorectal cancer focusing on lncRNAs in the adenoma-carcinoma transition. *BMC Cancer*, 19: 1059.
172. 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: 1820.
173. 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: 1864.
174. Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, Shah P, Sriram RK, Watkins TBK, Taunk NK, Duran M, Pauli C, Shaw C, Chadavada K, Rajasekhar VK, Genovese G, Venkatesan S, Birkbak NJ, McGranahan N, Lundquist M, LaPlant Q, Healey JH, Elemento O, Chung CH, Lee NY, Imielenski M, Nanjangud G, Pe'er D, Cleveland DW, Powell SN, Lammerding J, Swanton C, Cantley LC. (2018) Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*, 553: 467-472.
175. Kim YI. (2007) Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res*, 51: 267-292.
176. Price RJ, Lillycrop KA, Burdge GC. (2016) Folic acid induces cell type-specific changes in the transcriptome of breast cancer cell lines: a proof-of-concept study. *J Nutr Sci*, 5: e17.
177. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, Bjørnslett M, Meza-Zepeda LA, Eknæs M, Lind GE, Myklebost O, Skotheim RI, Sveen A, Lothe RA. (2017) Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer*, 16: 116.
178. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, Campan M, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. (2006) CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*, 55: 1000-1006.
179. Kuo CT, Chang C, Lee WS. (2015) Folic acid inhibits COLO-205 colon cancer cell proliferation through activating the FR α /c-SRC/ERK1/2/NF κ B/TP53 pathway: in vitro and in vivo studies. *Sci Rep*, 5: 11187.

180. Lin SY, Lee WR, Su YF, Hsu SP, Lin HC, Ho PY, Hou TC, Chou YP, Kuo CT, Lee WS. (2012) Folic acid inhibits endothelial cell proliferation through activating the cSrc/ERK 2/NF- κ B/p53 pathway mediated by folic acid receptor. *Angiogenesis*, 15: 671-683.
181. Liu Z, Jin X, Pi W, Liu S. (2017) Folic acid inhibits nasopharyngeal cancer cell proliferation and invasion via activation of FR α /ERK1/2/TSLC1 pathway. *Biosci Rep*. 37: BSR20170772.
182. Luo J, Li YN, Wang F, Zhang WM, Geng X. (2010) S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci*, 6: 784-795.
183. Pai CC, Kearsey SE. (2017) A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes*, 8: 57.
184. Catala GN, Bestwick CS, Russell WR, Tortora K, Giovannelli L, Moyer MP, Lendoiro E, Duthie SJ. (2019) Folate, genomic stability and colon cancer: The use of single cell gel electrophoresis in assessing the impact of folate in vitro, in vivo and in human biomonitoring. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 843: 73-80.
185. Ramírez T, García-Montalvo V, Wise C, Cea-Olivares R, Poirier LA, Herrera LA. (2003) S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. *Mutat Res*, 528: 61-74.
186. Ramírez T, Stopper H, Hock R, Herrera LA. (2007) Prevention of aneuploidy by S-adenosyl-methionine in human cells treated with sodium arsenite. *Mutat Res*, 617: 16-22.
187. Stempak JM, Sohn KJ, Chiang EP, Shane B, Kim YI. (2005) Cell and stage of transformation-specific effects of folate deficiency on methionine cycle intermediates and DNA methylation in an in vitro model. *Carcinogenesis*, 26: 981-990.
188. Ollikainen M, Ismail K, Gervin K, Kyllönen A, Hakkarainen A, Lundbom J, Järvinen EA, Harris JR, Lundbom N, Rissanen A, Lyle R, Pietiläinen KH, Kaprio J. (2015) Genome-wide blood DNA methylation alterations at regulatory elements and heterochromatic regions in monozygotic twins discordant for obesity and liver fat. *Clin Epigenetics*, 7: 39.
189. Chandra S, Baribault C, Lacey M, Ehrlich M. (2014) Myogenic differential methylation: diverse associations with chromatin structure. *Biology*, 3: 426-451.

190. Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. (2020) Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep*, 47: 4587-4629.
191. Zhang W, Liu HT. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12: 9-18.
192. Zhang YL, Wang RC, Cheng K, Ring BZ, Su L. (2017) Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer Biol Med*, 14: 90-99.
193. Yamaguchi H, Condeelis J. (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 642-652.
194. Gaykalova DA, Zizkova V, Guo T, Tiscareno I, Wei Y, Vatapalli R, Hennessey PT, Ahn J, Danilova L, Khan Z, Bishop JA, Gutkind JS, Koch WM, Westra WH, Fertig EJ, Ochs MF, Califano JA. (2017) Integrative computational analysis of transcriptional and epigenetic alterations implicates DTX1 as a putative tumor suppressor gene in HNSCC. *Oncotarget*, 8: 15349-15363.
195. Tao YF, Fang F, Hu SY, Lu J, Cao L, Zhao WL, Xiao PF, Li ZH, Wang NN, Xu LX, Du XJ, Sun LC, Li YH, Li YP, Xu YY, Ni J, Wang J, Feng X, Pan J. (2015) Hypermethylation of the GATA binding protein 4 (GATA4) promoter in Chinese pediatric acute myeloid leukemia. *BMC Cancer*, 15: 756.
196. Huang YW, Luo J, Weng YI, Mutch DG, Goodfellow PJ, Miller DS, Huang TH. (2010) Promoter hypermethylation of CIDEA, HAAO and RXFP3 associated with microsatellite instability in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 117: 239-247.
197. Sepulveda JL, Gutierrez-Pajares JL, Luna A, Yao Y, Tobias JW, Thomas S, Woo Y, Giorgi F, Komissarova EV, Califano A, Wang TC, Sepulveda AR. (2016) High-definition CpG methylation of novel genes in gastric carcinogenesis identified by next-generation sequencing. *Mod Pathol*, 29: 182-193.
198. Musialik E, Bujko M, Kober P, Wypych A, Gawle-Krawczyk K, Matysiak M, Siedlecki JA. (2015) Promoter methylation and expression levels of selected hematopoietic genes in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res*, 50: 26-32.
199. Weng W, Yang Q, Huang M, Qiao Y, Xie Y, Yu Y, jing A, Li Z. (2011) c-Myc inhibits TP53INP1 expression via promoter methylation in esophageal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 405: 278-284.
200. Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Newsheer S, Kryston TB, Bonner WM, Georgakilas AG, Sedelnikova OA. (2010) Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 17992-17997.

201. Zhang H, Jiang H, Chen L, Liu J, Hu X, Zhang H. (2018) Inhibition of Notch1/Hes1 signaling pathway improves radiosensitivity of colorectal cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 5: 364-370.
202. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. (2010) STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol*, 91: 506-514.
203. Gan Y, Ye F, He XX. (2020) The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges. *J Cancer*. 11: 2252-2264.
204. Ayesha M, Majid A, Zhao D, Greenaway FT, Yan N, Liu Q, Liu S, Sun MZ. (2022) MiR-4521 plays a tumor repressive role in growth and metastasis of hepatocarcinoma cells by suppressing phosphorylation of FAK/AKT pathway via targeting FAM129A. *J Adv Res*, 36: 147-161.
205. Sun B, Cong D, Chen K, Bai Y, Li J. (2021) Prognostic value of microRNA-4521 in non-small cell lung cancer and its regulatory effect on tumor progression. *Open Med*, 16: 1150-1159.
206. Xing S, Tian Z, Zheng W, Yang W, Du N, Gu Y, Yin J, Liu H, Jia X, Huang D, Liu W, Deng M. (2021) Hypoxia downregulated miR-4521 suppresses gastric carcinoma progression through regulation of IGF2 and FOXM1. *Mol Cancer*, 20: 9.
207. Saha SK, Kim K, Yang GM, Choi HY, Cho SG. (2018) Cytokeratin 19 has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells. *Int J Mol Sci*, 19: 1423.
208. Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Simillis C, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. (2020) The role of Neurotensin and its receptors in non-gastrointestinal cancers: a review. *Cell Commun Signal*, 18: 68.
209. Akter H, Yoon JH, Yoo YS, Kang MJ. (2018) Validation of Neurotensin Receptor 1 as a Therapeutic Target for Gastric Cancer. *Mol Cells*, 41: 591-602.
210. Song Y, He S, Ma X, Zhang M, Zhuang J, Wang G, Ye Y, Xia W. (2020) RBMX contributes to hepatocellular carcinoma progression and sorafenib resistance by specifically binding and stabilizing BLACAT1. *Am J Cancer Res*, 10: 3644-3665.
211. Yan Q, Zeng P, Zhou X, Zhao X, Chen R, Qiao J, Feng L, Zhu Z, Zhang G, Chen C. (2021) RBMX suppresses tumorigenicity and progression of bladder cancer by interacting with the hnRNP A1 protein to regulate PKM alternative splicing. *Oncogene*, 40: 2635-2650.

212. Alam E, Maaliki L, Nasr Z. (2020) Ribosomal protein S3 selectively affects colon cancer growth by modulating the levels of p53 and lactate dehydrogenase. *Mol Biol Rep*, 47: 6083-6090.
213. Rui X, Huang Z, Chen R, Chen Y, Wang Y, Huang Z. (2022) RPS3 Promotes the Metastasis and Cisplatin Resistance of Adenoid Cystic Carcinoma. *Front Oncol*, 12: 804439.
214. Huang T, Ji Y, Hu D, Chen B, Zhang H, Li C, Chen G, Luo X, Zheng XW, Lin X. (2016) SNHG8 is identified as a key regulator of epstein-barr virus(EBV)-associated gastric cancer by an integrative analysis of lncRNA and mRNA expression. *Oncotarget*, 7: 80990-81002.
215. Dong J, Teng F, Guo W, Yang J, Ding G, Fu Z. (2018) lncRNA SNHG8 Promotes the Tumorigenesis and Metastasis by Sponging miR-149-5p and Predicts Tumor Recurrence in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 51: 2262-2274.
216. Zhang C, Li H, Gao J, Cui X, Yang S, Liu Z. (2021) Prognostic significance of ANO1 expression in cancers. *Medicine*, 100: e24525.
217. Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, Rothwell C, Clay I, Duss S, Rebhan M, Raman P, Guy CT, Wetzel K, George E, Popa MO, Lilley S, Choudhury H, Gosling M, Wang L, Fitzgerald S, Borawski J, Baffoe J, Labow M, Gaither LA, Bentires-Alj M. (2013) Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E1026-34.
218. Xu M, Wang Y, Xia R, Wei Y, Wei X. (2021) Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Prolif*, 54: e13115.
219. Hao Q, Vadgama JV, Wang P. (2020) CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Commun Signal*, 18: 82.
220. Tu MM, Abdel-Hafiz HA, Jones RT, Jean A, Hoff KJ, Duex JE, Chauca-Diaz A, Costello JC, Dancik GM, Tamburini BAJ, Czerniak B, Kaye J, Theodorescu D. (2020) Inhibition of the CCL2 receptor, CCR2, enhances tumor response to immune checkpoint therapy. *Commun Biol*, 3: 720.
221. Rogic A, Pant I, Grumolato L, Fernandez-Rodriguez R, Edwards A, Das S, Sun A, Yao S, Qiao R, Jaffer S, Sachidanandam R, Akturk G, Karlic R, Skobe M, Aaronson SA. (2021) High endogenous CCL2 expression promotes the aggressive phenotype of human inflammatory breast cancer. *Nat Commun*, 12: 6889.
222. Cui Q, Xing J, Gu Y, Nan X, Ma W, Chen Y, Zhao H. (2019) GXYLT2 accelerates cell growth and migration by regulating the Notch pathway in human cancer cells. *Exp Cell Res*, 376: 1-10.

223. Liu F, Yang Z, Zheng L, Shao W, Cui X, Wang Y, Jia J, Fu Y. (2021) A Tumor Progression Related 7-Gene Signature Indicates Prognosis and Tumor Immune Characteristics of Gastric Cancer. *Front Oncol*, 11: 690129.
224. Amin R, Shukla A, Zhu JJ, Kim S, Wang P, Tian SZ, Tran AD, Paul D, Cappell SD, Burkett S, Liu H, Lee MP, Kruhlak MJ, Dwyer JE, Simpson RM, Hager GL, Ruan Y, Hunter KW. (2021) Nuclear pore protein NUP210 depletion suppresses metastasis through heterochromatin-mediated disruption of tumor cell mechanical response. *Nat Commun*, 12: 7216.
225. Chen J, Yang HM, Zhou HC, Peng RR, Niu ZX, Kang CY. (2020) PRR11 and SKA2 promote the proliferation, migration and invasion of esophageal carcinoma cells. *Oncol Lett*, 20: 639-646.
226. Zhan Y, Wu X, Zheng G, Jin J, Li C, Yu G, Li W. (2020) Proline-rich protein 11 overexpression is associated with a more aggressive phenotype and poor overall survival in ovarian cancer patients. *World J Surg Oncol*, 18: 318.
227. Lebrun JJ. (2012) The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol*, 2012: 381428.
228. Barcellos-Hoff MH, Akhurst RJ. (2009) Transforming growth factor- β in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Res*, 11: 202.
229. Zhuo C, Wu X, Li J, Hu D, Jian J, Chen C, Zheng X, Yang C. (2018) Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Biosci Rep*, 38: BSR20180580.
230. Cai X, Liu C, Zhang TN, Zhu YW, Dong X, Xue P. (2018) Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. *J Cell Biochem*, 119: 4717-4728.
231. Vu T, Datta PK. (2017) Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, 9: 171.
232. Liu QZ, Gao XH, Chang WJ, Gong HF, Fu CG, Zhang W, Cao GW. (2015) Expression of ITGB1 predicts prognosis in colorectal cancer: a large prospective study based on tissue microarray. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 12802-12810.
233. Valcz G, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Kalmár A, Patai ÁV, Wichmann B, Dede K, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. *Mod Pathol*, 29: 928-938.
234. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, Pasche B, Lee C, Grippo PJ. (2014) TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 106: djt369.

235. de Aberasturi AL, Calvo A. (2015) TMRSS4: an emerging potential therapeutic target in cancer. *Br J Cancer*, 112: 4-8.
236. Du L, Li J, Lei L, He H, Chen E, Dong J, Yang J. (2018) High Vimentin Expression Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with Meta-Analysis and TCGA Database. *Biomed Res Int*, 2018: 6387810.
237. Hui Y, Zeng H, Feng Y, Qin W, Chen P, Huang L, Zhong W, Lin L, Lv H, Qin Xue. (2021) Regulatory role of SFN gene in hepatocellular carcinoma and its mechanism. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 26: 375-383.
238. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997) 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1: 3-11.
239. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401: 616-620.
240. Shiba-Ishii A, Kim Y, Shiozawa T, Iyama S, Satomi K, Kano J, Sakashita S, Morishita Y, Noguchi M. (2015) Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Mol Cancer*, 14: 142.
241. Hu Y, Zeng Q, Li C, Xie Y. (2019) Expression profile and prognostic value of SFN in human ovarian cancer. *Biosci Rep*, 39: BSR20190100.
242. Reis H, Pütter C, Megger DA, Bracht T, Weber F, Hoffmann AC, Bertram S, Wohlschläger J, Hagemann S, Eisenacher M, Scherag A, Schlaak JF, Canbay A, Meyer HE, Sitek B, Baba HA. (2015) A structured proteomic approach identifies 14-3-3Sigma as a novel and reliable protein biomarker in panel based differential diagnostics of liver tumors. *Biochim Biophys Acta*, 1854: 641-650.
243. Plant HC, Kashyap AS, Manton KJ, Hollier BG, Hurst CP, Stein SR, Francis GD, Beadle GF, Upton Z, Leavesley DI. (2014) Differential subcellular and extracellular localisations of proteins required for insulin-like growth factor- and extracellular matrix-induced signalling events in breast cancer progression. *BMC Cancer*, 14: 627.
244. Price RJ, Jordan Price R, Lillycrop KA, Burdge GC. (2015) Folic acid supplementation in vitro induces cell type-specific changes in BRCA1 and BRCA2 mRNA expression, but does not alter DNA methylation of their promoters or DNA repair. *Nutr Res*, 35: 532-544.
245. Mahmood N, Cheishvili D, Arakelian A, Tanvir I, Khan HA, Pépin AS, Szyf M, Rabbani SA. (2018) Methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) supplementation

attenuates breast cancer growth, invasion, and metastasis; therapeutic and chemopreventive applications. *Oncotarget*, 9: 5169-5183.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. 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***

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**

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**

11.2. Egyéb –nem 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***

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***

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***

Barták BK, Fodor T, Kalmár A, Nagy ZB, **Zsigrai S**, Szigeti KA, Valcz G, Igaz P, Dank 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***

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 O, Kalmár A, Sebestyén A, Dankó T, Kriston C, Fűri I, Hollósi P, Csabai I, Wichmann B, Krenács T, Barták BK, Nagy ZB, **Zsigrai S**, Barna G, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2020) Promoter Hypomethylation and Increased Expression of the Long Non-coding RNA LINC00152 Support Colorectal Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 26(4):2209-2223. doi: 10.1007/s12253-020-00800-8. **IF: 3,201**

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**

Valcz G, Buzás EI, Kittel Á, Krenács T, Visnovitz T, Spisák S, Török G, Homolya L, **Zsigrai S**, Kiszler G, Antalffy G, Pálóczi K, Szállási Z, Szabó V, Sebestyén A, Solymosi N, Kalmár A, Dede K, Lőrincz P, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2019) En bloc release

of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. J Extracell Vesicles, 8(1):1596668. doi: 10.1080/20013078.2019.1596668. **IF: 14,976**

Σ IF: 52,814

*várható impaktfaktor érték

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik PhD-munkám elkészítésében szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:

- programvezetőimnek, Tulassay Zsolt professzor úrnak és Molnár Béla professzor úrnak, valamint a laboratóriumunknak helyet adó Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika, illetve Belgyógyászati és Onkológiai Klinika igazgatóinak, Igaz Péter professzor úrnak és Takács István professzor úrnak, hogy lehetővé tették és elősegítették kutatómunkám megvalósulását;
- témavezetőmnek, Molnár Béla professzor úrnak, aki megtanított a kutatói szemléletmódra és az absztrakt gondolkodásra. Szorgalma, munkatempója és érdekfeszítő előadásmódja mindig inspirálóan hatott rám. Irányítása alatt egy korszerűen felszerelt laboratóriumban dolgozhattam, emellett pedig lehetőséget teremtett arra, hogy számos hazai és nemzetközi konferencián is bemutathassam eredményeimet;
- a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium kutatóinak és a kutatásokat lehetővé tevő munkatársainak, Berczik Máriának, Felletár Ildikónak, Dr. Galamb Orsolyának, Dr. Kalmár-Söpkéz Alexandrának, Dr. Kothalawala Williamnek, Dr. Molnár Barbarának, Dr. Nagy Zsófiának, Dr. Papp Mártonnak, Dr. Patai Árpádnak, Dr. Szabó Gittának, Dr. Szabó Vanesszának, Szigeti Krisztinának, Dr. Valcz Gábornak és Dr. Wichmann Barnabásnak, akik idővel nem csak kollégáimmá, hanem igaz barátaimma is váltak. Amellett, hogy rengeteg metodikát elsajátíthattam általuk, szakmai tapasztalatuk hatalmas segítség volt számomra a kutatói élet útvesztőiben. Nagyon hálás vagyok, hogy egy olyan közösség tagjaként tölthettem a doktorandusz éveimet, ahol a jóindulat és az önzetlen segítségnyújtás alapvetőek voltak;
- a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet kutatóinak, Dr. Sebestyén Annának, Dankó Titanillának és Dr. Barna Gábornak, akik energiájukat nem kímélve segítettek a sejtenyésztés alapjainak elsajátításában, valamint lehetőséget teremtettek *in vitro* kísérleteim megvalósítására;
- az ELTE TTK Komplex Rendszerek Fizikája Tanszék kutatóinak, Csabai István professzor úrnak, Dr. Pipek Orsolyának és Dr. Medgyes-Horváth Annának, a

bioinformatikai elemzésekben nyújtott segítségükért;

- házi bírálómnak, Dr. Tőke Juditnak, dolgozatom alapos áttekintéséért;
- végül, de nem utolsó sorban családomnak, akik biztos háttérrel teremtettek számomra és mindvégig szeretettel támogattak munkám során, valamint barátaimnak, akik mellettem álltak és hittek bennem. Sikerült a terv!