

A vastagbél-daganatok kialakulásában szerepet játszó
DNS metilációs eltérések vizsgálata
a sejten kívüli DNS frakcióban

Doktori tézisek

Molnár Barbara Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Peták István, Ph.D., tudományos igazgató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára, Ph.D., habil. egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos
főmunkatárs
Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

**Budapest
2018**

1. BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések a leggyakoribb halált okozó betegségek közé tartoznak világszerte. A vastagbélrákot (CRC) folyamatosan emelkedő incidencia és halálozási arány jellemzi: a második leggyakoribb daganattípus Európában az emlődaganatok után 447.000 újonnan felfedezett esettel évente, illetve mortalitás szempontjából nézve is a második helyet foglalja el a tüdő tumorokat követve. Hazánkban az évente újonnan regisztrált betegek száma 9000 körül mozog, és a CRC mintegy 6000 halálesetet okoz.

A vastagbélrák kialakulását az egészséges vastagbél nyálkahártya sejtjeiben bekövetkező karcinogének okozta, vagy örökletes genetikai és epigenetikai változások indukálják. Az epigenetikai módosulások közül az egyik legjelentősebb a DNS citozin bázisát érintő metiláció. A folyamat során a citozin 5. szénatomjára metil-csoport kerül, elsősorban a gének promóter régióiban található citozin-guanin dinukleotid (CpG) helyeken. A promóterekben történő fokozott metiláció a transzkripció csökkenését, vagy teljes gátlását okozza. A metil-csoport bizonyos transzkripciós faktorok kötődését fizikailag is gátolja, emellett pedig olyan metil-CpG kötő fehérjék kapcsolódhatnak hozzá, amelyek további faktorokat toborozva a kromatin struktúra megváltozását, és ezáltal a gén inaktiválódását idézik elő. A DNS-metilációs mintázat az életkor előrehaladásával folyamatosan változik, amelyet kor-függő (age-related) A-típusú metilációnak nevezünk. A rákos elváltozások esetén azonban találunk olyan géneket, amelyek kifejezetten daganat-specifikus metilációs mintázatot mutatnak, amellett, hogy genomszintű globális hipometiláció történik. Utóbbi esetben rák-függő (cancer-related) C-típusú metilációról beszélhetünk, ami többek között a CIMP+ fenotípusú daganatokban fordul elő.

A tumor szövetéből a nukleinsavak bekerülhetnek a véráramba, így a különböző genetikai és epigenetikai módosulások, többek között a DNS metilációs mintázata is vizsgálható a plazmában található sejten kívüli DNS (skDNS) frakcióban, amely egyszerű és ígéretes minimálisan invazív módszerré válhat a daganatok diagnosztizálására. A CRC korai felismerése nagyban növelheti a páciensek túlélési esélyeit, ezért lényeges a szűrőmódszerek folyamatos fejlesztése. Az eszközös vizsgálatok közül a kolonoszkópia a legelfogadottabb és leghatékonyabb, ún. gold standard CRC szűrési módszer. A folyamat azonban költséges, a betegek számára megterhelő és a szövődmények kialakulásának aránya is viszonylag magas, ezért a páciensek részvételi aránya alacsony. Emiatt egyre népszerűbbé és elérhetőbbé válnak a betegeket kímélő, nem invazív (pl. gFOBT, FIT teszt), vagy minimálisan invazív szűrőmódszerek. Az utóbbi csoportba tartoznak a vér-alapú szűrési technikák, amelyek

különböző biomarkerek azonosítását tűzték ki célul a szabad nukleinsav - többek között az skDNS - frakcióban.

A szabad DNS eredetére vonatkozóan több elmélet is létezik, amelyek szerint alapvetően két fő útvonalon kerülhet a DNS daganat esetén a véráramba: a sejt halálának bekövetkezése után apoptózissal vagy nekrozissal, illetve az élő egészséges és tumoros sejtek által aktívan kibocsátva. A legvalószínűbb azonban, hogy ezek a folyamatok együttesen zajlanak le a szervezetben. Az skDNS koncentrációja rosszindulatú daganatos betegekben magasabb, mint az egészségesekben vagy jóindulatú tumorok esetén. Azonban az skDNS mennyiségének emelkedése önállóan nem használható a daganatok biomarkereként, hiszen fokozott szabad DNS mennyiség nemcsak betegség, hanem például erőteljes fizikai aktivitás vagy a terhesség első trimesztere során is megfigyelhető. Ezért szükséges az adott tumorra specifikus jellemzőket vizsgálni a szabad DNS frakcióban, úgymint a szomatikus mutációk, a rendellenes mikroszatellita mintázatok, vagy az epigenetikai változások, mint a tumor-specifikus DNS metilációs mintázat. A szakirodalomban ismertek olyan gének, amelyek fokozott metilációt mutatnak vastagbélrákban, és ez a változás plazma mintákban is kimutatható. Az egyik legismertebb vastagbélrák-specifikus epigenetikai marker a septin 9 (*SEPT9*). A gén megváltozott metilációs státuszát elemző módszer a kereskedelmi forgalomban lévő, Epigenomics cég által fejlesztett Epi proColon 2.0 néven kapható minimálisan invazív vastagbélrák szűrő teszté nőtte ki magát. A teszt 68-72%-os szenzitivitás és 89-93%-os specificitás értékekkel képes a CRC kimutatására, azonban elsősorban az előrehaladott stádiumok felismerésében megbízható, adenóma és korai CRC esetén alacsonyabb az érzékenysége. Ezért szükségessé váltak újabb és megbízhatóbb, metilációs mintázat változáson alapuló biomarkerek azonosítása a szabad DNS frakcióban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ph.D. munkám során a következő céljaim voltak:

1. A sejten kívüli szabad DNS (skDNS) felszabadulásának vizsgálata SHO egér/HT-29 kolorektális adenokarcinóma sejtvonal xenograft modell alkalmazásával.
2. Az skDNS stabilitásának meghatározása mesterségesen létrehozott és egészséges, valamint tumoros C57BL/6 egerek véráramába juttatott metilált és nem-metilált DNS szakaszok degradációjának nyomon követésével.
3. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* előzetesen kiválasztott DNS metilációs markerek vizsgálata egészséges, adenómás és vastagbélrákos betegek vastagbél szövet- és plazmamintáiban.
4. A négy vizsgált marker DNS metilációs mintázatának *in silico* validációja bioinformatikai módszerekkel független szöveti mintákon.
5. A DNS metilációs változás fehérje expresszióra gyakorolt hatásának elemzése a kolorektális adenóma – karcinóma szekvencia során.
6. Különböző vérvételi gyűjtőcsövek és skDNS izolálási módszerek hatásának vizsgálata az izolált szabad DNS mennyiségére és a 4 célgén DNS metilációs mintázatára.
7. A kereskedelmi forgalomban kapható, *SEPT9* gén DNS metilációs szintjén alapuló Epi proColon 2.0 teszt érzékenységének összevetése az általunk összeállított biomarker pannellel.

3. MÓDSZEREK

Kísérleteink folyamán állatmodellekkel, valamint humán vastagbél szövet- és plazmamintákkal dolgoztunk. Az egérkísérletek során, a sejten kívüli DNS felszabadulását és degradációját 8-8 egér segítségével tanulmányoztuk. A humán minták elemzésekor összesen 193 egészséges vagy tumor melletti ép szövet (NAT), 191 adenómás (AD) és 254 vastagbélrákos (CRC) páciens szövet- vagy plazmamintáját vizsgáltuk különböző módszerekkel.

3.1. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával

3.1.1. Sejten kívüli DNS felszabadulásának elemzése

Munkánk során először az skDNS eredetének elemzését, valamint a felszabadulási ütemének és sebességének nyomon követését végeztük. A 8 héten keresztül tartó állatkísérletet SHO egér/HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal xenograft modell segítségével valósítottuk meg. Az egerektől heti egy alkalommal vettünk vért, majd plazmát szeparáltunk és izoláltuk a szabad DNS frakciót. Ezután bioinformatikai úton kiválasztott, és előzetes kísérletekkel ellenőrzött egér és humán gének kópiaszámát vizsgálva következtettünk az állatok vérében megjelenő humán DNS mennyiségére, amelynek növekedését mértük az idő elteltével. Ehhez valós idejű polimeráz láncreakciót (RT-PCR) alkalmaztunk. A minták mellett egy 7 tagból álló kalibrációs hígítási sort is készítettünk, amihez viszonyítva tudtunk következtetni az egér/humán DNS arányára, és megállapíthattuk a kísérleti modellünk érzékenységét. Eredményeink segítségével meghatároztuk a humán tumorsejtekből az egerek keringési rendszerébe kerülő skDNS frakció arányát, ezáltal mérhettük a felszabadulás ütemét.

3.1.2. Sejten kívüli DNS degradációjának vizsgálata

Kísérletünk során mesterségesen létrehozott, majd négy egészséges és négy C38 egér kolorektális adenokarcinóma tumorsejtekkel oltott C57BL/6 egerek véráramába juttatott DNS szakaszok degradációját tanulmányoztuk. A vizsgálatot *in vitro* metilált és nem-metilált DNS fragmentumokkal végeztük. A kezeléshez szükséges DNS szakaszok előállításához humán HT-29 sejtvonalból DNS-t izoláltunk, majd PCR módszerrel felszaporítottuk a humán gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) gén körülbelül 3000 bázispár méretű szakaszát. A tisztított PCR terméket 2 db egészséges és 2 db tumoros egérnek előzetesen metilált formában, míg a másik csoportba tartozó egereknek nem-metilált formában

injektáltuk. A 8 db egértől 5 alkalommal vettünk vért, közvetlen a kezelés előtt, majd a kezelés után 1, 3, 6 és 24 órával. A plazma frakció szeparálása után szabad DNS-t izoláltunk, majd a DNS mintákra 19 specifikus, egyenletesen elhelyezkedő és egymással átfedő PCR primer-párt (próbát) használtunk a 3000bp méretű bejuttatott humán DNS szakasz kimutatására. A valós idejű PCR-t követően az eredményként kapott Ct-értékekből következtettünk a degradáció mértékére, és összehasonlíthattuk az egészséges és tumoros, illetve a metilált/nem-metilált PCR termékek bomlásának ütemét.

3.2. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban

Az állatkísérletek elvégzése után a DNS metilációs mintázat, majd a szabad DNS frakció elemzését célzó vizsgálatokat humán mintákon is folytattuk. Négy kiválasztott marker (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) DNS metilációs mintázatát elemeztük, összesen 166 beteg szövet- és plazmamintáit felhasználva. A gének kiválasztása kutatócsoportunk korábbi vizsgálatait illetve irodalmi adatok alapján történt.

3.2.1. A négy kiválasztott gén DNS metilációjának elemzése friss-fagyasztott szöveti mintákban

Az *SFRP1*, az *SFRP2* és a *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálatára kutatócsoportunk korábbi piro szekvenálási eredményei szolgáltak alapul. Egy további marker, az *SDC2* irodalmi adatok alapján került kiválasztásra. Annak érdekében, hogy az *SDC2* metilációjának változását kísérletes eredményekkel is igazoljuk szöveti mintákban, piro szekvenálást alkalmaztunk GS Junior rendszeren 454 technológia (Roche Applied Science, Németország) használatával. A vizsgálathoz 15 NAT, 15 adenóma és 15 CRC friss-fagyasztott szöveti mintát gyűjtöttünk. A makrodisszekált mintákból történő DNS izolálást és biszulfid konverziót az EZ DNA Methylation Direct Kit (Zymo Research, USA) segítségével hajtottuk végre. Biszulfid-specifikus PCR után piro szekvenáltuk a mintákat, majd a 4 vizsgált génhez tartozó 44 CpG pozíció metilációs státuszát határoztuk meg a promóter régiókban. A későbbiekben ugyanezeket a szakaszokat elemeztük egyéb módszerekkel szövet és plazma mintákon.

3.2.2. A 4 vizsgált gén metilációs mintázatának *in silico* verifikációja független szöveti mintákon

Kutatócsoportunk által publikált, hipermetilált DNS szakaszok tisztításán alapuló (Methyl capture – MetCap) szekvenálási módszerrel kapott 6 NAT, 15 AD és 9 CRC biopszia minta

metilációs eredményeit *in silico* elemeztük. Azokat az eltérően metilált régiókat (differentially methylated region – DMR) vizsgáltuk, amelyek átfednek a piroszekvenálással tanulmányozott szakaszokkal, majd a későbbiekben MethyLight PCR-rel is elemeztünk 4 génhez (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) tartozó DNS régiókkal. Meghatároztuk a vizsgált DMR-ek metilációs fokát, azaz β -értékét, majd kiszámoltuk a $\Delta\beta$ -értékeket, amelyek a mintacsoportok közötti átlag metilációs különbségeket jelentik.

A kiválasztott négy gén metilációs státuszát a teljes promóter szakaszon is elemeztük a Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas – TCGA) és az NCBI Gene Expression Omnibus (GEO - GSE48684) adatbázisokból letöltött metilációs eredmények használatával. Összesen 99 CpG hely metilációs státuszát, azaz β -értékét határoztuk meg, majd szintén kiszámoltuk a $\Delta\beta$ -értékeket.

3.2.3. A DNS metilációs változás fehérje expresszióra gyakorolt hatásának elemzése

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a DNS metiláció befolyásolja-e a kiválasztott négy gén fehérje termékeinek kifejeződését, immunhisztokémiai elemzéseket végeztünk 11 egészséges, 11 AD és 10 CRC formalin-fixált paraffinba ágyazott mintán. A deparaffinálást és rehidratálást követően mikrohullámú antigén feltárást végeztünk Tris-EDTA pufferben (pH 9.0). Az immunhisztokémiai jelölést követően a tárgylemezeket Panoramic 250 Flash II digitális szkennelvel archiváltuk (3DHISTECH Kft.), majd a metszeteket Panoramic Viewer (3DHISTECH Kft.) szoftver segítségével szemi-kvantitatív módon értékeltük Quick-score (Q) módszert használva.

3.2.4. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán szövet- és plazmamintákban MethyLight PCR módszerrel

A MethyLight módszerrel történő metilációs szint meghatározására 37 egészséges, 37 adenómás és 47 CRC-s betegtől gyűjtöttünk plazma mintát, valamint 32 betegtől párosított biopszia mintákat is elemeztünk. A szövetekből a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science) segítségével izoláltunk DNS-t, plazma minták esetében a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kitet (Roche Applied Science) alkalmaztuk a szabad DNS kinyerésére. Biszulfid konverziót követően egy multiplex preamplifikációs lépést végeztünk el biszulfid-specifikus primerekkel, amely során a kiválasztott szakaszokat metilációs állapottól függetlenül sokszoroztuk fel. Ezután MethyLight PCR módszerrel mutattuk ki a biszulfid konverzió után bekövetkezett metilációtól függő szekvencia különbségeket metiláció-specifikus primereket használva. A minták metilációjának meghatározása a metilált és nem-

metilált DNS-t tartalmazó kontrollok áttörési pontja (Ct-érték) alapján számolt egyenlet szerint történt. Azokat a mintákat tekintettük metiláltként, amelyek Ct-értéke a 0%-ban és 100%-ban metilált standard minták Ct-értéke között helyezkedett el.

3.2.5. Különböző vérvételi gyűjtőcsövek és skDNS izolálási módszerek hatásának vizsgálata az izolált skDNS mennyiségére és a 4 elemzett gén metilációs mintázatára

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a különböző vérvételi gyűjtőcsövek és skDNS izolálási módszerek milyen hatással vannak az izolált skDNS mennyiségére és a 4 kiválasztott gén metilációs mintázatára. Összesen 139 vérmintát elemeztünk, 5 adenóma és 5 CRC vérmintát Cell-Free DNA BCT® (Streck, Németország) gyűjtőcsőbe vettünk le, a többi vérmintát standard K3EDTA csövekbe gyűjtöttünk. A Streck csöveket azért fejlesztették ki, hogy növeljék a szabad DNS stabilitását a vérvételi időponttól a centrifugálásig eltelt, megnövekedett időtartam esetén is. A plazmák szeparálása után a szabad DNS frakció kinyerése 3 különböző kézi [High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche Applied Science); Epi proColon 2.0 Kit (Epigenomics AG); Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit (Zymo Research)] és 2 automata [InviGenius, InviGenius PLUS (STRATEC Biomedical AG)] módszerekkel történt. Biszulfid konverziót követően a metilációs szint meghatározása az előzőekben említett MethyLight PCR módszerrel valósult meg.

3.2.6. Az Epi proColon 2.0 teszt érzékenységeinek összevetése az általunk összeállított biomarker panellel

Vizsgálataink folyamán 10 egészséges, 10 adenómás és 20 CRC-s beteg vérmintáit gyűjtöttük össze K3EDTA vérvételi csövekben. A plazma elválasztása után három különböző módszerrel izoláltunk szabad DNS-t: High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kittel, Epi proColon 2.0 manuális módszerrel és az InviGenius automatával. A *SEPT9* gén metilációs állapotát az Epi proColon Sensitive PCR Kit (Epigenomics AG) segítségével mértük. A PCR során a metiláció mértékére a Ct-értékekből következtítettünk kalibrációs görbe segítségével, amelyhez biszulfid konvertált metilált kontroll DNS-t alkalmaztunk. A PCR elvégzése után meghatároztuk a szenzitivitás és specificitás értékeket, majd összevetettük az eredményeinkkel, amelyben az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* metilációját vizsgáltuk egészséges, adenómás és CRC betegektől származó plazmamintákban.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával

4.1.1. A szabad DNS felszabadulásának elemzése

A szabad DNS tumorszövetből történő felszabadulásának ütemét egér/humán xenograft modell segítségével vizsgáltuk, és a használt módszer érzékenységét egy 7 tagból álló hígítási sor segítségével határoztuk meg. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a módszer olyan érzékenységű, hogy nagy biztonsággal képes kimutatni 0,1%-os humán DNS tartalmat az egér plazmamintákból. A kalibrációs pontokra illesztett egyenesek egyenletével meghatároztuk a humán DNS tartalmat, amelyet minden mintára átlagoltunk. A HT-29 sejtek egerekre történő oltása után a humán skDNS tartalom az első 2 hétben a kimutathatósági határ alatt volt, a 3. hét végére viszont elérte a 0,1%-os arányt. A következő napokban folyamatos emelkedést tapasztaltunk, az 56. napra a humán DNS aránya elérte a 18,26%-ot, ami azt jelenti, hogy a véráramban található skDNS közel 1/5-e a humán daganatsejtekből származott.

4.1.2. A sejten kívüli DNS lebomlásának vizsgálata

Az egerek véráramába injektált nem-metilált és metilált DNS szakaszok lebomlási sebessége eltért. Egészséges egerekből származó mintákban a bejuttatott humán nem-metilált DNS szakaszok 1 óra elteltével nagy koncentrációban voltak kimutathatók. A 3 órás mintákban nagyfokú degradációt figyeltünk meg, ami a 6 órás mintákban tovább fokozódott, a 24 órás mintáknál pedig már olyan mértékű volt, hogy a kimutathatósági határ alá csökkent a fragmentumok jelenléte. A mesterségesen metilált DNS minta sokkal stabilabbnak mutatkozott, mivel a 3 és 6 órás mintákból is viszonylag nagy mennyiségben kimutattuk a humán amplikont. Továbbá, a 3000bp-os molekula bizonyos fragmentumai még 24 óra elteltével is detektálhatóak voltak. Összehasonlítva a tumoros és egészséges egerekből származó mintákat megfigyeltük, hogy a daganatos állatokba injektált nem-metilált amplikon a kezelés után 6 órával jelen volt a véráramban, a metilált fragmentum pedig 24 óra elteltével is nagyobb mennyiségben kimutatható volt, mint az egészséges állatokban.

4.2. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban

4.2.1. Piroszekvenálási adatok kiértékelése

A négy elemzett gén (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) promóter régiójában 44 CpG helyet választottunk ki, amelyeknek megállapítottuk a DNS metilációs szintjét a piroszekvenálást követően. Az *SFRP1* esetében 10-ből 9, az *SDC2*-ben 18-ből 17, az *SFRP2* és *PRIMA1* esetében pedig az összes CpG pozíció szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutatott a CRC-s mintákban az egészségeshez képest ($p < 0,05$). A CpG pozíciók többsége már adenóma mintákban is fokozott metilációt mutatott.

4.2.2. A 4 kiválasztott gén DNS metilációs mintázatának *in silico* vizsgálata

A 4 gén metilációs állapotát *in silico* elemeztük kutatócsoportunk által publikált methyl capture szekvenálással kapott metilációs adatain. Az *SFRP1* és az *SDC2* promóterekben vizsgált DMR-ek szignifikánsan magasabb metilációt mutattak mind az adenóma (*SFRP1* $\Delta\beta=0,60$; *SDC2* $\Delta\beta=0,65$ és $0,50$), mind a vastagbélrákos (*SFRP1* $\Delta\beta=0,49$; *SDC2* $\Delta\beta=0,59$ és $0,37$) biopsziákban a NAT-hoz képest ($p < 0,01$). Fokozott metilációt találtunk a *PRIMA1* promóterében is adenómákban a NAT mintákhoz képest ($\Delta\beta=0,29$ és $0,43$) ($p < 0,01$). A CRC-s betegetől származó biopsziákban is emelkedett metilációt tapasztaltunk a kontrollokhoz viszonyítva ($\Delta\beta=0,07$ és $0,18$). Mérsékelt magas metilációt találtunk az *SFRP2* gén esetében AD és CRC mintákban egyaránt, és adenómákban szignifikáns is volt az eltérés a NAT mintákhoz képest ($\Delta\beta=0,29$ és $0,07$) ($p < 0,05$). A 4 gén teljes promóter régiójának DNS metilációját is megvizsgáltuk a TCGA, illetve GEO adatbázisban található metilációs array adatokat felhasználva. Mindkét adatbázis szerint a 99 vizsgált CpG pozíció többsége emelkedett metilációt jelzett mind az adenóma, mind a CRC mintákban a kontrollokhoz viszonyítva.

4.2.3. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének promóter metilációjának hatása a fehérjék expressziójára

Az *SFRP1* esetében csökkent (+2 és +1) fehérje expressziót tapasztaltunk mind a hám, mind a strómális sejtekben adenóma (ΣQ -score: $237,22 \pm 51,96$) és CRC (ΣQ -score: $199,16 \pm 54,71$) mintákban egyaránt, szignifikáns eltérést az egészséges és CRC minták között találtunk ($p < 0,001$). Erős (+3) citoplazmatikus *SFRP2* kifejeződést figyeltünk meg az egészséges felszíni hámokban, ezzel ellentétben, az adenómákban és a rákos mintákban alacsonyabb (+1 és 0) *SFRP2* fehérje szintet detektáltunk (ΣQ -scores: AD: $253,34 \pm 43,01$; CRC: $228,75 \pm 40,86$). Az egészséges hám és stróma rétegben az *SDC2* fehérje mérsékelt (+2) citoplazmatikus és magfestődést mutatott (ΣQ -score: $281,42 \pm 44,13$). Szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb (+2 and +1) fehérje kifejeződést figyeltünk meg az adenóma (ΣQ -score: $202,00 \pm 30,84$) és rákos (ΣQ -score: $198,34 \pm 53,14$) mintacsoportokban egyaránt. Erős

(+3) citoplazmatikus *PRIMA1* expressziót detektáltunk a normális vastagbél mintákban (Σ Q-score: $416 \pm 32,86$), és szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$) kifejeződést láttunk az adenóma (Σ Q-score: $305 \pm 33,91$) és a tumoros (Σ Q-score: $281,66 \pm 64,93$) szövetekben is.

4.2.4. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán szövet- és plazmamintákban

Az elemzett 4 gén promótereinek átlag metilációja adenóma szöveti mintákban $41,39 \pm 29,58\%$ -os, $6,7 \pm 6,61\%$ -os; $35,48 \pm 38,69\%$ -os, illetve $10,76 \pm 25,46\%$ -os volt. A fenti arányok CRC-s biopsziákban tovább emelkedtek, az egészséges mintákban azonban szignifikánsan alacsonyabb metilációs értékeket találtunk ($p < 0,05$). A párosított plazmamintákban a szöveti mintákban mérthez hasonló tendenciát figyeltünk meg. A 121 plazma elemzése során megállapítottuk, hogy a metiláció gyakorisága mind a négy marker esetében szignifikánsan magasabb volt az elváltozásokban az egészséges mintákban tapasztaltakhoz viszonyítva ($p < 0,0002$; minden esetben). Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* promóterek metilációját a CRC minták 85,1%-ában (40/47), 72,3%-ában (34/47), 89,4%-ában (42/47), illetve 80,9%-ában (38/47), valamint az adenómák 89,2%-ában (33/37), 83,8%-ában (31/37), 81,1%-ában (30/37), és 70,3%-ában (26/37) figyeltük meg. A metiláció szintjének elemzésekor folyamatos emelkedést figyeltünk meg az egészséges – vastagbél adenóma – karcinóma szekvencia során. A kontroll mintákban az átlag metiláció aránya 1% alatti volt mind a négy marker esetében. Adenómákban a legmagasabb metilációs szintet a *PRIMA1* gén promóterében találtunk ($4,73 \pm 6,41\%$), a rákos mintákban pedig az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációja $21,77 \pm 33,32\%$ -osnak; $6,82 \pm 17,1\%$ -osnak; $12,06 \pm 24,37\%$ -osnak és $13,66 \pm 25,14\%$ -osnak adódott. A 4 marker szenzitivitás és specificitás értékeinek megállapítása Receiver Operating Characteristic (ROC) elemzéssel történt. Megállapítottuk, hogy a markerek magas érzékenységgel és specifikusan képesek elkülöníteni a rákos mintákat az egészségesektől (91,5%-os szenzitivitás, 97,3%-os specificitás). Az adenóma minták szintén nagy hatásfokkal megkülönböztethetők a kontrolloktól a 4 tanulmányozott marker segítségével (89,2%-os szenzitivitás, 86,5%-os specificitás).

4.2.5. Különböző vérvételi gyűjtőcsövek és skDNS izolálási módszerek hatásának elemzése a metilációs mintázatra

A különböző vérvételi csövek (Streck és K3EDTA) használata után megfigyeltük, hogy a szabad DNS mennyiség tekintetében nincs lényegi különbség a két gyűjtési mód között sem adenóma sem CRC mintákban ($p = 0,86$). 4 gén metilációjának szintje viszont a CRC

mintákban magasabb volt a standard K3EDTA csövek alkalmazása során. A különbség az *SFRP1* és az *SDC2* markereknél szignifikánsnak mutatkozott ($p < 0,05$). Az izolálási módszerek vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az izolált szabad DNS szintjét befolyásolja DNS kinyerés módja. Az InviGenius műszerrel magasabb, azonban az InviGenius PLUS használata után alacsonyabb mennyiségeket detektáltunk a kézi izolálásokhoz képest. A metiláció tekintetében minden esetben magasabb metilációs szintet tapasztaltunk a manuális DNS kinyerés után az adenóma és CRC mintákban is az automatákhoz viszonyítva.

4.2.6. Az Epi proColon 2.0 teszt érzékenységeinek összevetése az általunk összeállított biomarker panellel

A *SEPT9* pozitívásra az RT-PCR során kapott Ct-értékekből következtettünk. Az egészséges minták esetén az Epi proColon és InviGenius izolálás után 10-ből 2-2 minta jelzett *SEPT9* metilációt. Az automata izolálással egy adenóma minta sem mutatkozott metiláltnak, az Epi proColon kitet használva pedig a 10-ből 6 AD mintában találtunk metilált *SEPT9*-et. A CRC-s betegekből származó plazmamintákat vizsgálva megállapítottuk, hogy az Epi proColon manuális izolálással a betegek 95%-a kiszűrhető, a másik módszerrel azonban a rákos mintáknak csupán a fele detektálható. A *SEPT9* tesztet az általunk vizsgált génekkal összehasonlítva megállapítottuk, hogy adenóma mintákban mind a 4 marker esetében magasabb szenzitivitás értékeket kaptunk (80% felett), míg a vastagbélrákos minták esetén az Epi proColon tesztéhez hasonló érzékenységet értünk el. A specificitás tekintetében - a *PRIMA1* gén kivételével - nagyobb értékeket kaptunk az általunk vizsgált gének esetében, mint a *SEPT9* teszttel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Ph.D. munkám során első lépésként a sejten kívüli DNS (skDNS) mennyiségi és minőségi jellemzőit elemeztem állatmodellek segítségével. Megállapítottam, hogy az SHO egerekre oltott humán HT-29-eredetű tumorból DNS molekulák szabadulnak ki, amelyek a teljes szabad DNS frakció megközelítőleg 20%-át teszik ki. Az irodalmi adatokkal összhangban tehát azt találtam, hogy a tumor növekedése folyamán megemelkedett skDNS szinthez az egészséges és rákos sejtek egyaránt hozzájárulnak. Az egészséges és C38 tumorra oltott C57BL/6 egereken végzett szabad DNS stabilitására vonatkozó vizsgálataim azt mutatták, hogy az *in vitro* metilált humán DNS fragmentumok lassabb degradációval jellemezhetőek, hiszen PCR módszerrel az injektlást követő 24 órával később is kimutathatók a vérben, ellentétben a nem-metilált szakaszokkal. A tumorra oltott állatokban a DNS szakaszok stabilabbnak mutatkoztak, mint az egészséges egerekben, ami feltételezéseink szerint részben a daganatos állatokban lecsökkent DNáz enzim aktivitásnak köszönhető. Az állatkísérletek eredményeire alapozva a szabad DNS frakció és a DNS metilációs mintázat elemzését célzó vizsgálataimat humán mintákon is folytattam. A humán plazmamintákon végzett kísérleteim szerint elmondható, hogy négy kiválasztott gén - *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, *PRIMA1* - metilációs státusza alapján az adenómás, illetve CRC-s betegek magas szenzitivitással és specificitással elkülöníthetőek az egészségesektől. A metilációs állapot változásával kapcsolatos megfigyeléseimet humán szöveti mintákon is bizonyítottam. Az általam használt multiplex preamplifikációt tartalmazó kétlépeses MethyLight PCR módszernek köszönhetően az alacsony szabad DNS koncentrációjú plazmamintákban is azonosítani tudtam a fokozott metilációt mutató géneket, valamint a metiláció foka is mérhetővé vált. Számos mintaelőkészítési protokollt teszteltem, és megfigyeléseim szerint az eltérő módszereken alapuló skDNS izolálási technikák a kinyert DNS mennyiségén kívül a metilációs státuszt is befolyásolják. Végül megállapítottam, hogy a 4 génből összeállított metilációs panel egyéb minimálisan invazív vastagbélrák szűrő teszthez viszonyítva is nagy érzékenységgel mutatja ki már a rákmegelőző állapotokat is. Összefoglalva tehát, munkám során kialakítottam egy DNS metilációs változáson alapuló, vastagbél adenómát és rákot is jelző módszert, ami a betegség jelenlétét a perifériás vérből is képes nagy biztonsággal kimutatni. Kutatási eredményeim ezáltal lehetőséget adnak egy alternatív, minimálisan invazív diagnosztikai eljárás kidolgozásához, amely a betegek számára kevésbé megterhelő, ezzel növelve a vizsgálaton történő részvételi arányt.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Barták BK, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. (2018) Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. *Pathol Oncol Res*, [Nyomtatás alatt] doi: 10.1007/s12253-018-0382-z. **IF: 1,736**

Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. (2018) [In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation]. A sejten kívüli szabad DNS felszabadulásának és degradációjának in vivo elemzése. *Orv Hetil*, 159(6): 228–238. **IF: 0,349**

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(9):751-763. doi: 10.1080/15592294.2017.1356957. **IF: 4,394**

Tóth K, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 16(2): 239-252. doi: 10.1586/14737159.2016.1132164.

Galamb O, Kalmár A, Péterfia B, Csabai I, Bodor A, Ribli D, Krenács T, Patai ÁV, Wichmann B, **Barták BK**, Tóth K, Valcz G, Spisák S, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics*, 11(8): 588-602. doi: 10.1080/15592294.2016.1190894. **IF: 4,394**

Molnár B, Tóth K, **Barták BK**, Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*, 15(2): 171-184. doi: 10.1586/14737159.2015.975212.

Barták BK, Nagy ZB, Molnár B, Spisák S, Tulassay Z. (2012) A sejten kívüli szabad DNS, mint lehetséges jelátviteli molekula molekuláris és funkcionális vizsgálatainak áttekintése. *Magy Belorv Arch*, 65(3): 148-156.

6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények

Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, **Barták BK**, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2018) [Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer]. A DNS-metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során. *Orv Hetil*, 159(1): 3-15. doi: 10.1556/650.2018.30927.

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(1): 22. doi: 10.1186/s13148-016-0305-3. **IF: 4,987**

Nagy ZB, **Barták BK**, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Dank M, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Comparison of circulating miRNAs expression alterations in matched tissue and plasma samples during colorectal cancer progression. *Pathol Oncol Res*, [Nyomtatás alatt] doi: 10.1007/s12253-017-0308-1. **IF: 1,736**

Tóth K, Patai ÁV, Kalmár A, **Barták BK**, Nagy ZB, Galamb O, Wichmann B, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Circadian rhythm of methylated Septin 9, cell-free DNA amount and tumor markers in colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res*, 23(3): 699-706. doi: 10.1007/s12253-016-0174-2. **IF: 1,736**

Patai ÁV, **Barták BK**, Péterfia B, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, Péter Z, Patai Á, Valcz G, Kalmár A, Tóth K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Comprehensive DNA methylation and mutation analyses reveal a methylation signature in colorectal sessile serrated adenomas. *Pathol Oncol Res*, 23(3): 589-594. doi: 10.1007/s12253-016-0154-6. **IF: 1,736**

Galamb O, Kalmár A, **Barták BK**, Patai ÁV, Leiszter K, Péterfia B, Wichmann B, Valcz G, Veres G, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Aging related methylation influences the gene expression of key control genes in colorectal cancer and adenoma. *World J Gastroenterol*, 22(47): 10325-10340. doi: 10.3748/wjg.v22.i47.10325. **IF: 3,365**

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2016) miRNA Isolation from FFPE Specimen: A technical comparison of miRNA and total RNA isolation methods. *Pathol Oncol Res*, 22(3): 505-513. doi: 10.1007/s12253-015-0027-4. **IF: 1,736**

Patai ÁV, Valcz G, Hollósi P, Kalmár A, Péterfia B, Patai Á, Wichmann B, Spisák S, **Barták BK**, Leiszter K, Tóth K, Sipos F, Kovalszky I, Péter Z, Miheller P, Tulassay Z, Molnár B.

(2015) Comprehensive DNA methylation analysis reveals a common ten-gene methylation signature in colorectal adenomas and carcinomas. *PLoS One*, 10(8): e0133836. doi: 10.1371/journal.pone.0133836. **IF: 3,057**

Kalmár A, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Tóth K, Leiszter K, Nielsen BS, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Gene-expression analysis of a colorectal cancer-specific discriminatory transcript set on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. *Diagn Pathol*, 10(1): 126. doi: 10.1186/s13000-015-0363-4. **IF: 1,895**

Fűri I, Kalmár A, Wichmann B, Spisák S, Schöller A, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Cell free DNA of tumor origin induces a 'metastatic' expression profile in HT-29 cancer cell line. *PLoS One*, 10(7): e0131699. doi: 10.1371/journal.pone.0131699. **IF: 3,057**

Kalmár A, Péterfia B, Wichmann B, Patai ÁV, **Barták BK**, Nagy ZB, Furi I, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Comparison of automated and manual DNA isolation methods for DNA methylation analysis of biopsy, fresh frozen, and formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *J Lab Autom*, 20(6): 642-651. doi: 10.1177/2211068214565903. **IF: 1,297**

Spisák S, Solymosi N, Ittész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, **Barták BK**, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z, Szállási Z, Rasmussen S, Sicheritz-Ponten T, Brunak S, Molnár B, Csabai I. (2013) Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*, 8(7): e69805. doi: 10.1371/journal.pone.0069805. **IF: 3,534**

Nagy ZB, **Barták BK**, Molnár B, Spisák S, Tulassay Z. (2012) A keringô és szöveti mikro-rns-ek szerepe és kimutatásuk lehetôségei daganatos megbetegedésekben. *Magy Belorv Arch*, 65(3): 157-164.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik Ph.D. munkám elkészítésében segítségemre voltak:

- programvezetőmnek, *Prof. Dr. Tulassay Zsolt* egyetemi tanárnak, akadémikusnak, valamint a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi Igazgatóinak *†Prof. Dr. Rácz Károly* egyetemi tanárnak és *Prof. Dr. Igaz Péter* egyetemi tanárnak, hogy támogatták munkám elkészítését;
- témavezetőmnek, *Dr. Molnár Béla* tudományos tanácsadónak, hogy irányítása alatt dolgozhattam a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratóriumban;
- *Dr. Müllner Katalin* és *Dr. Nagy Géza* házi opponenseimnek Ph.D. dolgozatom alapos áttekintéséért;
- mentoromnak, *Dr. Spisák Sándornak*, aki elindított a kutatói pályán és átadta a megfelelő kutató szemléletmódot;
- *Dr. Kalmár Alexandrának* szakmai tanácsaiért, a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért és barátságáért;
- *Dr. Galamb Orsolyának*, aki szakmai tapasztalatával mindig a segítségemre volt;
- *Nagy Zsófia Brigittának* a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségéért és barátságáért;
- *Dr. Valcz Gábornak* az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséért;
- *Dr. Wichmann Barnabásnak* a statisztikai elemzések kivitelezéséért;
- *Kónyáné Farkas Gabriella*, *Tóth Bernadett* és *Kovács Hajnalka* asszisztenseknek az immunhisztokémiai munkában és mintagyűjtésben nyújtott segítségükért;
- A Molekuláris Gasztroenterológiai Laboratórium munkatársainak: *Dr. Tóth Kingának*, *Dr. Patai V. Árpádnak*, *Dr. Péterfia Bálintnak*, *Dr. Schöller Andreának*, *Dr. Leiszter Katalinnak*, *Dr. Fűri Istvánnak*, *Dr. Zsigrai Sárának* és *Szigeti Krisztinának* támogatásukért;
- *Berczik Máriának* az adminisztratív feladatok megoldásában nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
- a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópia személyzetének, akik nélkül a klinikai minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg;
- végül, de nem utolsó sorban *Szüleimnek*, *Testvéreimnek*, *Férjemnek*, minden *Családtagomnak* és *Barátaimnak*, akik Ph.D. munkám alatt végig bíztattak és a nehéz helyzetekben is mellettem álltak.