

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2846.**

**SZIGETI KRISZTINA ANDREA**

**Gastroenterológia**  
című program

Programvezető: Dr. Molnár Béla, kutatóprofesszor

Témavezető: Dr. Molnár Béla, kutatóprofesszor

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

Doktori értekezés

**Szigeti Krisztina Andrea**

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

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

Budapest  
2023

## Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>12</b>
2.1. A vastagbél-daganatok.....	12
2.1.1. A vastagbél-daganatok epidemiológiája .....	12
2.1.2. A vastagbél-daganatok kialakulása és szövettani megjelenési formái .....	12
2.1.3. A vastagbélrák progressziója és klinikai osztályozási rendszerei .....	14
2.1.4. A vastagbél-daganatok molekuláris osztályozása.....	15
2.2. A DNS-metiláció .....	19
2.2.1. Epigenetikai áttekintés.....	19
2.2.2. A DNS-metiláció és funkciója.....	20
2.2.3. A DNS-metiláció enzimatis háttere .....	21
2.2.4. A DNS-metiláció metabolikus alapjai.....	24
2.2.5. A DNS-metilációs mintázat jellegzetes megváltozása az �rege�es folyamata és a daganatok kialakulása során .....	27
2.2.6. A globális DNS-hipometil�acio jelensége vastagbél-daganatokban .....	30
2.2.7. A sejten kívüli szabad DNS jellemzése és diagnosztikai jelentősége .....	36
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>39</b>
<b>4. MÓDSZEREK .....</b>	<b>41</b>
4.1. Betegek és minták.....	41
4.1.1. A globális DNS-metil�acio változásának vizsgálata és kialakulásának hátterében álló lehetséges okok felt�erk�epezes�e .....	42
4.1.2. K�ul�nbs�oz�o metodikai faktorok globális DNS-metil�acios mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata .....	44
4.2. DNS-izolálás és kvantifikálás.....	47
4.3. LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás.....	47
4.4. <i>In silico</i> génexpresszió analízis .....	48
4.5. Immunhisztokémia .....	49

4.6. Statisztikai vizsgálatok .....	50
4.6.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának hátterében álló lehetséges okok feltérképezése .....	50
4.6.2. Különböző metodikai faktorok globális DNS-metilációs mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata .....	50
<b>5. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>51</b>
5.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának hátterében álló lehetséges okok feltérképezése .....	51
5.1.1. Szövetminták globális DNS-metilációjának vizsgálata LINE-1 biszulfid- piroszekvenálással .....	51
5.1.2. Plazmaminták globális DNS-metilációjának vizsgálata LINE-1 biszulfid- piroszekvenálással .....	53
5.1.3. A DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó enzimek in silico génexpressziós vizsgálata .....	54
5.1.4. A <i>DNMT</i> és <i>FOLR2</i> gének mRNS-expressziójának validálása immunhisztokémiával.....	56
5.1.5. Az <i>MTHFR</i> gén mutációs státusza és a globális DNS-metilációs szint közötti összefüggés elemzése .....	58
5.1.6. A metildonor molekulák mennyiségének vizsgálata vastagbéliszövetben immunhisztokémiával.....	60
5.2. Különböző metodikai faktorok globális DNS-metilációs mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata .....	61
5.2.1. A LINE-1 szakaszok promóter régiójában található CpG-pozíciók metilációja .....	61
5.2.2. A kolorektális szövetbiopsziák gyűjtési technikái, illetve a szövetfixálásra alkalmazott metodikák LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának analízise .....	62
5.2.3. Különböző tárolási kondíciók hatása a LINE-1 metilációra .....	63
5.2.4. A metilált és nem metilált DNS-standardok LINE-1 metilációja.....	66
5.2.5. Az életkor és a nemek hatása a LINE-1 metilációra .....	66
<b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>68</b>

6.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának háttérben álló lehetséges okok feltérképezése .....	69
6.1.1. A globális DNS-metiláció vizsgálata vastagbéliszövet- és plazmamintákban LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással .....	69
6.1.2. A DNS-metiláció kialakulásának háttérben álló lehetséges okok elemzése	71
6.2. Különböző metodikai faktorok globális DNS-metilációs mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata .....	77
6.2.1. A LINE-1 szakaszok promóter régiójában található CpG-pozíciók metilációja .....	79
6.2.2. Az eltérő mintagyűjtési technikák és a szövetminták fixálására alkalmazott különböző metodikák LINE-1 metilációra gyakorolt hatása.....	79
6.2.3. Különböző tárolási kondíciók hatása a LINE-1 metilációra .....	80
6.2.4. Az életkor és a nemek hatása a LINE-1 metilációra .....	83
6.3. Legfőbb új megállapítások .....	83
<b>7. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>86</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>88</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>89</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>90</b>
<b>11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>121</b>
11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények .....	121
11.2. Nem az értekezés témájában megjelent közlemények .....	121
<b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>124</b>
<b>13. FÜGGELÉK .....</b>	<b>126</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>1C</b>	egy szénatomos
<b>5fC</b>	5-formilcitozin
<b>5-formil-THF</b>	5-formil-tetrahydrofolát
<b>5hmC</b>	5-hidroximetilcitozin
<b>5hmU</b>	5-hidroximetiluracil
<b>5kaC</b>	5-karboxilcitozin
<b>5mC</b>	5-metilcitozin
<b>5,10-metenil-THF</b>	5,10-metenil-tetrahydrofolát
<b>5,10-metilén-THF</b>	5,10-metilén-tetrahydrofolát
<b>5-metil-THF</b>	5-metil-tetrahydrofolát
<b>10-formil-THF</b>	10-formil-tetrahydrofolát
<b>AD</b>	kolorektális adenóma
<b>AID/APOBEC</b>	aktiváció által indukált citidin-dezamináz / apolipoprotein B mRNS szerkesztő enzim, katalitikus polipeptid (activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide)
<b>AJCC</b>	Amerikai Rákellenes Tanács (American Joint Committee on Cancer)
<b>APC</b>	adenomatosus polyposis coli
<b>ATIC</b>	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formiltranszferáz (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase)
<b>A-típusú</b>	öregedéshez társult (age-related)
<b>ATP</b>	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
<b>AUC</b>	görbe alatti terület (area under curve)
<b>BER</b>	báziskivágó hibajavítás (base excision repair)

<b>BRAF</b>	v-raf egérszarkóma virális onkogén homológ B1 (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
<b>C9orf50</b>	kromoszóma 9 nyitott leolvasási keret 50 (chromosome 9 open reading frame 50)
<b>CD</b>	Crohn-betegség (Crohn's disease)
<b>CDKN2A</b>	ciklindependens-kináz inhibitor 2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A)
<b>CI</b>	konfidenciaintervallum (confidence interval)
<b>CIMP-H</b>	magas szintű CpG-sziget metilátor fenotípus (high level CpG island methylator phenotype)
<b>CIMP-L</b>	alacsony szintű CpG-sziget metilátor fenotípus (low level CpG island methylator phenotype)
<b>CIN</b>	kromoszomális instabilitás (chromosomal instability)
<b>CMS</b>	konszenzus molekuláris alcsoport (consensus molecular subtype)
<b>COBRA</b>	kombinált biszulfid-restrikciós analízis (combined bisulfite restriction analysis)
<b>CpG</b>	citozin-foszfát-guanin dinukleotid (cytosine-phosphate-guanine dinucleotide)
<b>CRC</b>	vastagbélrák (colorectal cancer)
<b>C-típusú</b>	karcinogenezishez társult (cancer-related)
<b>DAB</b>	diamino-benzidin
<b>DCC</b>	kolorektális karcinómában törölt (deleted in colorectal carcinoma)
<b>DHF</b>	dihidrofolát
<b>DNMT</b>	DNS-metiltranszferáz
<b>dTMP</b>	dezoxi-timidin-monofoszfát

	(deoxythymidine monophosphate)
<b>dUMP</b>	dezoxi-uridin-monofoszfát (deoxyuridine monophosphate)
<b>E</b>	endoszkópos minták
<b>E2F6</b>	E2F transzkripció faktor 6 (E2F transcription factor 6)
<b>ELISA</b>	enzim kapcsolt immunsorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>EMT</b>	epiteliális-mezenchimális tranzíció
<b>EN</b>	endonukleáz
<b>ep</b>	epitélsejt
<b>EZH2</b>	zeste 2 polikomb represszív komplex 2 alegység enhanszere (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit)
<b>FC</b>	expressziós intenzitáskülönbség (fold change)
<b>FDA</b>	Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszer-engedélyeztetési Hivatala (The United States Food and Drug Administration)
<b>FF</b>	friss-fagyasztott (fresh-frozen)
<b>FFPE</b>	formalinfixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded)
<b>FOLR2</b>	folátreceptor 2 (folate receptor 2)
<b>FR<math>\beta</math></b>	folátreceptor $\beta$
<b>GART</b>	foszforibozil-glicinamid formiltranszferáz (phosphoribosylglycinamide formyltransferase)
<b>GEO</b>	Génexpressziós Adatbázis (Gene Expression Omnibus)
<b>HDAC</b>	hiszton-deacetiláz
<b>HDI index</b>	emberi fejlettségi index (human development index)



<b>HE</b>	heterozigóta
<b>HERV</b>	humán endogén retrovírusok (human endogenous retroviruses)
<b>HPLC-UV</b>	UV-detekcióval kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet detection)
<b>HTA</b>	Humán Transzkriptom Array (Human Transcriptome Array)
<b>I</b>	festődési intenzitás
<b>IBD</b>	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
<b>IRF8</b>	interferon regulátor faktor 8 (interferon regulatory factor 8)
<b>KCNJ12</b>	befelé egyenirányító kálium csatorna J alcsalád 12-es tagja (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 12)
<b>KoRep</b>	transzkripció korepresszorok
<b>KRAS</b>	kirsten-patkányszarkóma virális onkogén (kirsten rat sarcoma viral proto-oncogene)
<b>LC-MS/MS</b>	tandem tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia (liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry)
<b>LINE-1</b>	hosszú közbeiktatott szakasz 1 (long interspersed nuclear element-1)
<b>LTR</b>	hosszú terminális ismétlődések (long terminal repeats)
<b>LOH</b>	heterozigócia elvesztése (loss of heterozygosity)
<b>M</b>	műtéti minták
<b>MeCP2</b>	metil-CpG-kötő fehérje 2
<b>MeDIP-szekvenálás</b>	metilált DNS-immunoprecipitáláson alapuló szekvenálás (methylated DNA immunoprecipitation sequencing)

<b>MLH1</b>	MutL homológ 1 (MutL homolog 1)
<b>MMR</b>	össze nem illő nukleotidpárok javítása (mismatch repair)
<b>MRE-szekvenálás</b>	metilációszenzitív emésztést követő szekvenálás (methylation-sensitive restriction enzyme sequencing)
<b>MSI</b>	mikroszatellita-instabil
<b>MSI-H</b>	magas szintű mikroszatellita-instabilitás (high microsatellita instability)
<b>MSI-L</b>	alacsony szintű mikroszatellita-instabilitás (low microsatellita instability)
<b>MSP</b>	metilációs-specifikus PCR
<b>MSS</b>	mikroszatellita-stabil
<b>MTHFD1</b>	metilén-tetrahidrofolát-dehidrogenáz 1 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1)
<b>MTHFD2</b>	metilén-tetrahidrofolát-dehidrogenáz 2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2)
<b>MTHFR</b>	5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (methylenetetrahydrofolate reductase)
<b>Myc</b>	Myc protoonkogén
<b>N</b>	egészséges
<b>NAT</b>	tumor melletti ép szövet (normal tissue adjacent to tumor)
<b>NPY</b>	neuropeptide Y
<b>ORFp1</b>	nyitott leolvasási keret fehérje 1 (open reading frame protein 1)
<b>ORFp2</b>	nyitott leolvasási keret fehérje 2 (open reading frame protein 2)
<b>P</b>	pozitív sejtek százalékos aránya
<b>PENK</b>	proenkefalin
<b>pM</b>	távoli metasztázis
<b>pN</b>	regionális nyirokcsomó

<b>PRIMA1</b>	prolinban gazdag membrán horgony 1 (proline rich membrane anchor 1)
<b>ProtK</b>	proteináz K
<b>pT</b>	primer tumor
<b>qPCR</b>	kvantitatív polimeráz-lánreakció (quantitative polymerase chain reaction)
<b>Q-score</b>	Quick-score
<b>RK</b>	RNS-kötő
<b>ROC</b>	vevő működési karakterisztika (receiver operating characteristic)
<b>RRBS</b>	csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)
<b>RTr</b>	reverztranszkriptáz
<b>RT</b>	szobahőmérséklet
<b>SAH</b>	S-adenozil-homocisztein
<b>SAM</b>	S-adenozil-metionin
<b>SDC2</b>	szindekán 2 (syndecan 2)
<b>SEPT9</b>	szeptin 9 (septin 9)
<b>SFRP1</b>	szekretált frizzled-rokon fehérje 1 (secreted frizzled related protein 1)
<b>SFRP2</b>	szekretált frizzled-rokon fehérje 2 (secreted frizzled related protein 2)
<b>SHMT2</b>	szerin-hidroximetil-transzferáz 2 (serine hydroxymethyltransferase 2)
<b>SINE</b>	rövid közbeiktatott szakasz (short interspersed nuclear element)
<b>skDNS</b>	sejten kívüli szabad DNS
<b>SMAD4</b>	SMAD család 4. tagja (SMAD Family Member 4)
<b>st</b>	strómasejtek

<b>T</b>	timin
<b>TA</b>	tubuláris adenóma
<b>TAC</b>	Transzkriptomelemző Konzol (Transcriptome Analysis Console)
<b>TCGA</b>	Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas)
<b>TDG</b>	timin-DNS glikoziláz
<b>TET</b>	tíz-tizenegy transzlokáció (ten-eleven translocation)
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)
<b>TF</b>	transzkripciós faktor
<b>THF</b>	tetrahidrofolát
<b>TIMP3</b>	metalloproteináz szöveti inhibitor 3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3)
<b>TNM</b>	tumor, nyirokcsomó, metasztázis (tumor, node, metastasis)
<b>TP53</b>	tumor fehérje p53 (tumor protein p53)
<b>TUKEB</b>	Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
<b>TVA</b>	tubulovillózus adenóma
<b>TWIST1</b>	twist család BHLH transzkripciós faktor 1 (twistf family BHLH transcription factor 1)
<b>UC</b>	colitis ulcerosa
<b>UICC</b>	Nemzetközi Rákellenes Egyesülés (Unio Internationalis contra Cancrum)
<b>U</b>	uracil
<b>UTR</b>	nem transzlálódó régió (untranslated region)
<b>WHO</b>	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
<b>WIF1</b>	WNT-gátló faktor 1

	(WNT Inhibitory Factor 1)
<b>WT</b>	vad típus
<b>ZNF132</b>	cink-ujj fehérje 132 (zinc finger protein 132)

## **2. Bevezetés**

### **2.1. A vastagbél-daganatok**

#### **2.1.1. A vastagbél-daganatok epidemiológiája**

A Global Cancer Observatory (Globális, Daganatos Megbetegedéseket Megfigyelő Központ) legfrissebb, 2020-ban mért adatai alapján a különböző rákos kórfolyamatok megközelítőleg húszmillió újonnan diagnosztizált esetért és tízmillió halálesetért felelősek világszerte (1). Ezek közül a kolorektális rák (CRC, colorectal cancer) a harmadik legnagyobb incidenciával rendelkezik közel kétfélmillió regisztrált személlyel, továbbá mortalitás szempontjából a második helyet foglalja el, mintegy egymillió halálesetet számlálva. A nőket érintő CRC-s esetek a tumoros megbetegedések 9,4%-át, míg a férfiak esetén 10,6%-át adják, férfiak körében sajnálatos módon Magyarországon detektált legnagyobb országspecifikus előfordulási rátával a világon (1). Az előfordulási ráta folyamatos növekedése a jólét becslésére alkalmas HDI index (human development index, emberi fejlettségi index) szerinti közepes, illetve magas értékkel rendelkező országokban figyelhető meg, így például Kelet-Európa országaiban (2). A bemutatott statisztikai adatok magyarázatot adnak azon kutatások folyamatosan növekvő számára, amelyek középpontjában a vastagbélrák megelőzése, személyre szabott terápiája, illetve a mielőbbi felismerését segítő diagnosztikai módszerek kifejlesztése áll.

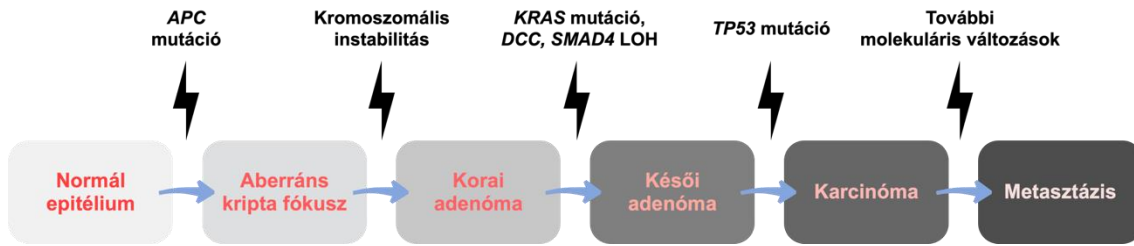
#### **2.1.2. A vastagbél-daganatok kialakulása és szövettani megjelenési formái**

A kolorektális daganatok kialakulása az ép vastagbélhámsejtekben felhalmozódó genetikai mutációk és epigenetikai változások által indukált folyamat (3). A tumorok 70-80%-a sporadikus megjelenést mutat, míg 20-30%-uk öröklött molekuláris komponensekkel rendelkezik (4). A sporadikus formák többségének kialakulása a Fearon és Vogelstein által leírt klasszikus ép-adenóma-karcinóma szekvencia mentén történik (4–6). A modell alapján a különböző mutációk akkumulációjának következtében az egészséges bélnyálkahártyából először rákmegelőző korai és késői adenóma állapotok jönnek létre, amelyek további molekuláris hatások által rosszindulatú adenokarcinómává

fejlődhetnek. Az útvonal korai molekuláris kulcslépése a hámsejtekben történő *APC* tumorszuppresszor gén mutációja, amely következtében kialakul az ún. aberráns kriptá fókusz (5,7). Az ezután bekövetkező globális DNS-hipometiláció és kromoszomális instabilitás hozzájárul a korai adenóma stádium létrejöttéhez. Az adenómákat érintő további mutációk - mint a *KRAS* mutációja, vagy a *DCC* és *SMAD4* allélek LOH (loss of heterozygosity; a heterozigócia elvesztése) általi elvesztése - szintén fontos molekuláris eseményeknek tekinthetők a konvencionális CRC kialakulása során. Végezetül, a modellben foglalt utolsó kulcsfontosságú mutáció a *TP53* gént érinti, ami az adenóma malignus transzformációjához vezet. További genetikai eltérések felhalmozódásával áttétképző vastagbél-daganat jöhet létre (1. Ábra) (5,7).

A konvencionális adenómák szövettani szempontból tubuláris, tubulovillózus, illetve villózus alcsoportokba oszthatók. A tubuláris csoportba sorolandók azok, amelyek kevesebb mint 25%-ban tartalmaznak villózus komponenst, míg azokat az eseteket, amelyek 25%-nál több, de 75%-nál kevesebb ilyen struktúrával rendelkeznek tubulovillózus adenómáknak nevezzük. A 75%-nál több villózus régiót magában foglaló adenómák alkotják a villózus csoportot (8). Ez a csoportosítás, illetve az arányok ismerete fontos, ugyanis a villózus komponenst magasabb arányban tartalmazó adenómák nagyobb valószínűséggel alakulnak karcinómává (9).

A klasszikus adenokarcinómák a regisztrált esetek közel 60%-át adják. Emellett a medulláris, mikropapilláris, fogazott, mucinózus és kribriiform karcinómák szintén magas arányban fordulnak elő. Azonban 1%-nál kevesebb gyakorisággal figyelhetők meg például a pecsétgyűrűsejtes, vagy a differenciálatlan vastagbél-tumorok, illetve hosszan fennálló gyulladós bélbetegség-asszociált típusok (10). A gyulladós bélbetegség (IBD, inflammatory bowel disease) világszerte nagy prevalenciával és növekvő incidenciával rendelkezik (11). Hagyományosan két fő csoportja - a Crohn-betegség (CD, Crohn's disease), illetve a colitis ulcerosa (UC) - különíthető el, azonban az IBD feltételezhetően igen heterogén kórfolyamat, amely több alesetet is magában foglal. Molekuláris kockázati tényezői számos kutatás középpontjában állnak, specifikus molekuláris különbségeken alapuló osztályozás létrehozása további elemzéseket igényel (12). Mind a CD, mind az UC esetén a betegség hosszan tartó fennállása növeli a CRC kialakulásának valószínűségét (12).



**1. Ábra. Fearon és Vogelstein által leírt klasszikus modell.** A normál epitélium sejteiben bekövetkező sorozatos mutációk eredményeképpen először az úgynevezett aberráns kripta fókusz kialakulása figyelhető meg, amely korai, illetve késői adenóma formákon keresztül rosszindulatú, akár áttétet is képző karcinómává fejlődhetnek. Ezen molekuláris változások közül az első kulcslépésnek tartott mutáció az *APC* gént érinti a még egészséges hámsejtekben. Ezután a kromoszomális instabilitás következtében kialakulnak a rákmegelőző adenómák, amelyekben a modell szerint további ún. driver mutációk halmozódnak fel, mint például a *KRAS* mutáció, vagy a *DCC*, illetve a *SMAD4* gént érintő heterozigócia elvesztése (LOH, loss of heterozogosity). Végül a malignus transzformációhoz vezető fontos mutáció a p53 tumorszuppresszor fehérjét kódoló génben következik be. A létrejövő rákos utódsejtek további molekuláris változások halmozásával válhatnak metasztázisképzővé (5,7).

### 2.1.3. A vastagbélrák progressziója és klinikai osztályozási rendszerei

A kolorektális karcinómák előrehaladottságának mértéke az endoszkóposan vagy műtéti úton nyert biopsziás minták patológiai elemzése során kerül megállapításra. A különböző osztályozási rendszerek figyelembe veszik a bélfal rétegeinek, a nyirokcsomók, illetve a közeli és a távoli szervek tumor általi érintettségét is. Fontos megemlíteni az első klinikumban elterjedten alkalmazott rendszert, a Dukes-féle klasszifikációt (13), amit később Astler és Coller módosított (14). Emellett mára már elterjedtebbé vált UICC (Unio Internationalis contra Cancrum, Nemzetközi Rákellenes Egyesülés) és az AJCC (American Joint Committee on Cancer, Amerikai Rákellenes Vegyes Bizottság) szervezetek által megalkotott ún. TNM rendszer, amelyben a “T” a primer tumort, az “N” a nyirokcsomó áttétet, az “M” pedig a távoli metasztázist jelöli. A WHO által készített összefoglaló az említett rendszerekről az 1. táblázatban látható (8,15).



**1. Táblázat. A vastagbél-daganatok osztályozásában alkalmazott rendszerek és kialakításuk főbb szempontjainak összefoglalása.** Akkoca és mtsai. alapján, módosítva (15). N: nyirokcsomó áttét, M: távoli áttét, T: primer tumor.

<b>A vastagbélrák stádiumainak klasszifikációja</b>			
<b>Stádiumok</b>	<b>Dukes-féle, Astler és Coller által módosított rendszer</b>	<b>TNM rendszer</b>	<b>Szöveti érintettség</b>
0	-	T <sub>is</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	<i>in situ</i> karcinóma
I.	A	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	mukóza, szubmukóza
	B1	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	muszkuláris propia
II.	B2	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	szubszeróza, perikólikus, perirektális szövet
	B3	T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	viszcerális peritóneum, környező szervek
II.	C1	T <sub>1-2</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	B1 és regionális nyirokcsomók
	C2	T <sub>3</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	B2 és regionális nyirokcsomók
	C3	T <sub>4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	B3 és regionális nyirokcsomók
IV.	D	T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>1</sub>	bármely T, N és távoli áttét

#### 2.1.4. A vastagbél-daganatok molekuláris osztályozása

A kolorektális rákok ma elterjedt klasszifikációinak alapjaként a tumorprogresszió során bekövetkező genetikai és epigenetikai események szolgálnak.

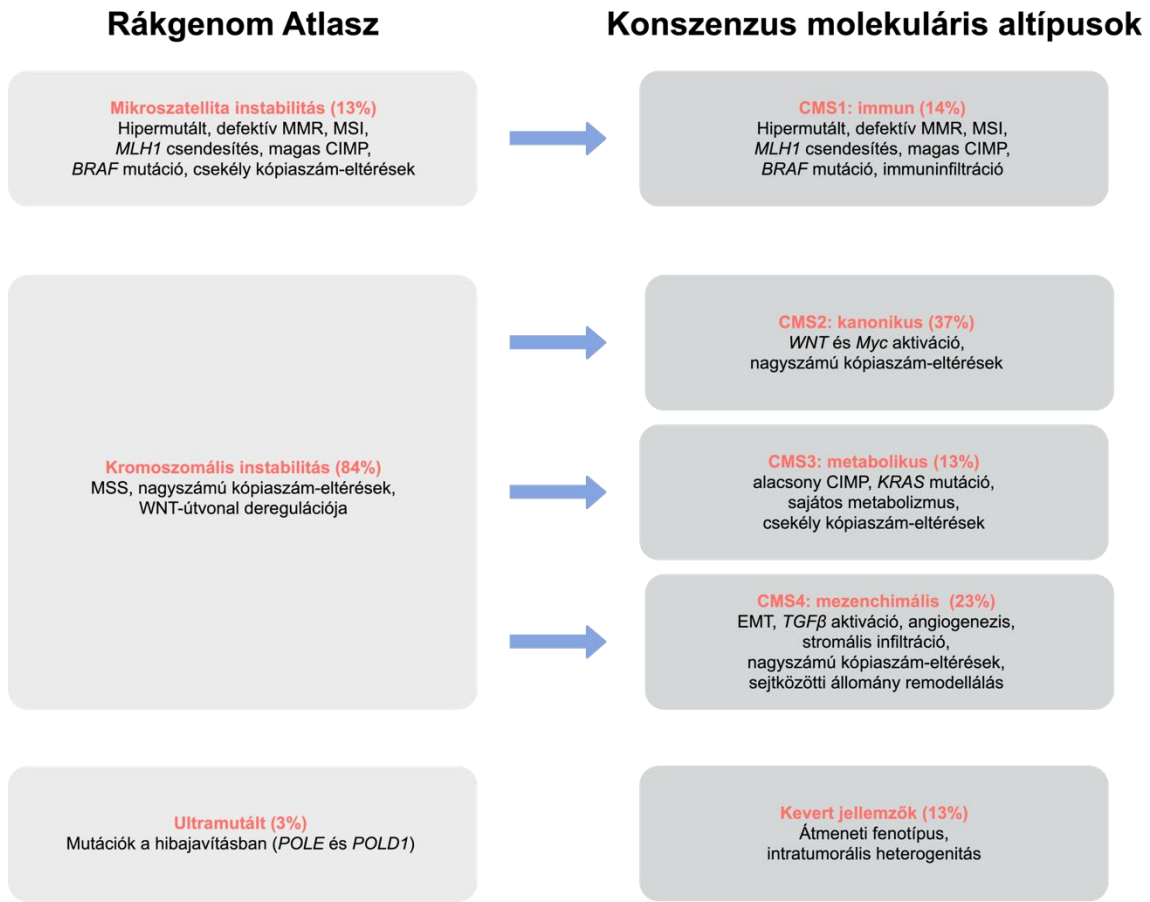
Genetikai mutációk során protoonkogének, vagy tumorszuppresszorok, valamint ezek szabályozó régióinak mutációja következik be, míg epigenetikai eltérések során az adott gén kifejeződése a szekvencia megváltozása nélkül módosul (7).

A hagyományos besorolás két fő molekuláris hajtóerőt határoz meg a vastagbél-daganatok kialakulása során: a CpG-sziget metilátor fenotípust (CIMP, CpG island methylator phenotype) és a genetikai instabilitást (16). CpG-sziget metilátor fenotípussal rendelkező tumorok (CIMP+) esetén egy epigenetikai módosulás, a DNS-metiláció mintázatában következik be változás, amely során a tumorszuppresszor gének promóter régiójának fokozott metilációja, ezáltal az adott gén expressziójának csökkenése vezet a daganat progressziójához (17,18). Genetikai instabilitás esetén beszélhetünk az egymás jelenlétét kizáró kromoszomális instabilitásról (CIN) és mikroszatellita-instabilitásról (MSI) (16,19), valamint az ultramutáns útvonalról a Rákgenom Atlasz (TCGA, The Cancer Genome Atlas) csoportosítása alapján (4,20).

A kromoszomális instabilitás a vastagbél-daganatok több mint 80%-ában megfigyelhető, jellemzően a Fearon és Vogelstein által leírt klasszikus útvonal szerint kialakuló tumorokat érintő molekuláris változás (4,5). CIN során a sejtosztódás folyamatában fellépő hiba eredményeképpen teljes kromoszómaszerelvények tűnhetnek el, illetve többszöröződhetnek meg (aneuploidia), vagy kromoszóma átrendeződések következtében - mint például deléció, inszerció és transzlokáció - csak bizonyos allélekre nézve változhat meg a ploidiaszám (19).

MSI esetén az ismétlődő nukleotidokból álló mikroszatellita-régiók hosszában következik be eltérés a veleszületett szekvenciahosszúsághoz képest (21). Ennek oka, hogy a DNS replikáció során létrejövő eltérések nem kerülnek korrigálásra az ún. MMR hibajavításban (mismatch repair, össze nem illő nukleotidpárok javítása) szereplő gének mutációinak következtében (21,22). Mikroszatellita-státusznak megfelelően elkülöníthetők egymástól az alacsony (MSI-L, microsatellite instability-low), illetve magas (MSI-H, microsatellite instability-high) mikroszatellita-instabilitással rendelkező tumorok, továbbá a mikroszatellita-státusz tekintetében stabil vastagbél-daganatok (MSS, microsatellite stable) (21). Az MSI-L és MSI-H tumorok a kolorektális karcinómák körülbelül 15%-át adják (19).

A 2015-ben publikált legfrissebb osztályozás szerint négy konszenzus molekuláris alcsoportot (CMS, consensus molecular subtype) különíthetünk el a vastagbél-daganatok vizsgálata során: CMS1 (immun), CMS2 (kanonikus), CMS3 (metabolikus) és CMS4 (mezenchimális). A CMS1 csoportba a kolorektális tumorok 14%-a tartozik, amelyek többségében hipermutált, hipermetilált, mikroszatellita-instabilitással rendelkező tumorok, továbbá jellemző rájuk az immuninfiltráció, illetve az immunválasz elkerülését eredményező génexpresszió. A CMS2 csoport tagjai a daganatok 37%-át adják, erős CIN-pozitivitást és a klasszikus vastagbél-daganatokra is jellemző WNT-út-vonal fokozott aktivitását mutatják, míg a CMS3 tumorok (13%) kisebb fokú kromoszóma-instabilitással és *KRAS* mutációval rendelkeznek, amely sajátos metabolikus adaptációt eredményez. A legrosszabb prognózissal járó CMS4 típusú CRC-kben (23%) az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) génjeinek felülexpresszióját, valamint a TGF $\beta$ , az angiogenezis és a sejtközötti-állomány remodellálásában résztvevő út-vonalak aktivációját is megfigyelhetjük (23). A Rákgenom Atlasz által létrehozott csoportosítást, illetve a konszenzus molekuláris altípusokat és a két osztályozás közötti kapcsolatot a 2. ábra foglalja össze.



**2. Ábra. A kolorektális rákok két legelterjedtebben alkalmazott molekuláris klasszifikációja.** A Rákgenom Atlasz (TCGA, The Cancer Genome Atlas) által létrehozott csoportosítás (bal oldal), illetve a konszenzus molekuláris altípusok (CMS, consensus molecular subtype) (jobb oldal) többnyire megfeleltethetők egymásnak. CMS1 csoportba a mikroszatellita instabilitásra jellemző tulajdonságokkal rendelkező tumorok tartoznak, CIN nem figyelhető meg az esetükben. A CMS2, 3 és 4-es típusok sajátosága a kromoszomális átrendeződések kisebb (CMS3), vagy jelentősebb mértéke (CMS2, CMS4), így ezek a daganatok a klasszikus CIN csoporttal vonhatók párhuzamba. Olyan tumorok is kialakulhatnak, amelyek a CMS osztályozás egyik ismertetett halmazába sem sorolhatóak, átmeneti fenotípussal, illetve intratumorális heterogenitással rendelkeznek. Ezek a konszenzus molekuláris altípusok osztályozásán belül, a kevert jellemzőkkel bíró tumorok csoportjába tartoznak. A TCGA-alapú klasszifikációban elkülönülnek továbbá az ultramutált vastagbélrákok, amelyek esetén megfigyelhető a replikációs apparátus epsilon és delta 1-es alegységének mutációja, ami a nukleotidok hibás beépülését, így

ultramutáns fenotípust eredményez. Ez a csoport nem feleltethető meg egyik CMS típusnak sem (4,20,23). Az ábra Müller és mtsai. alapján készült, módosítva (4).

## **2.2. A DNS-metiláció**

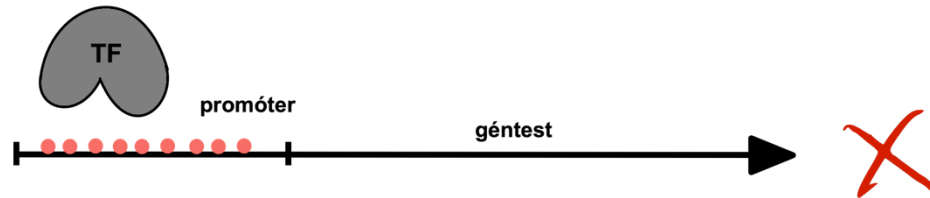
### **2.2.1. Epigenetikai áttekintés**

Az epigenetika fogalmát Conrad Waddington vezette be 1942-ben azon folyamatok összefoglalásaként, amelyek a genotípuson túl meghatározzák az adott fenotípust (24). Waddington az ún. epigenetikai tájkép jelenségével magyarázta a különböző szövetek kialakulásának lehetőségét azonos DNS-állomány mellett. Eszerint, ahogy egy dombtetőn elengedett üveggolyó különböző völgyeket bejárva érhet el eltérő végpontokat, úgy az azonos genetikai információval rendelkező sejtek különböző molekuláris útvonalakat bejárva más és más sejttypussá differenciálódhatnak (24). Évtizedekkel később ugyan, de a genetikai kutatások mellett az epigenetikai vizsgálatok száma is robbanásszerűen növekedni kezdett. Így mára már jól ismert, hogy az epigenetika tudományterületébe tartozó folyamatok képesek a genetikai információ kifejeződésének befolyásolására a DNS-molekulák nukleotidsorrendjének megváltoztatása nélkül (24). Az évek során három fő mechanizmust írtak le: a hiszton-modifikációt, a nem-kódoló RNS-eken alapuló folyamatokat, valamint a DNS-metilációt (24–27). A hisztonfehérjék N- és C-terminálisának módosítása (acetiláció, metiláció, szumoiláció, ubikvitináció, citrullináció és foszforiláció) előidézhetheti a kromatinszerkezet megváltozását, azaz a transzkripcionálisan aktív eukromatin és inaktív heterokromatin arányát módosíthatja (28). A kis nem-kódoló RNS-ek, az RNS interferencia révén képesek a genomban tárolt információ megnyilvánulását szabályozni az mRNS-molekulák degradálásával (26). A hosszú nem-kódoló RNS-ek többféle módon szabályozhatják a gének kifejeződését, mint például a transzkripció faktorok toborzásával vagy gátlásával, valamint a DNS-szál szupramolekuláris szerkezetének, illetve az mRNS-molekulák stabilizálásával (27). A DNS-metiláció a DNS-molekulák közvetlen kovalens módosítása által képes a génexpresszió direkt és indirekt regulációjára (29). PhD-munkám fókuszában ezen epigenetikai módosulás áll, így részletesebb ismertetése a további fejezetek tárgyát képezi.

### 2.2.2. A DNS-metiláció és funkciója

A nukleinsavak metilációja hosszú evolúciós múlttal rendelkezik, miszerint már az RNS-világban való jelenlétét is feltételezik, illetve lehetséges védelmi funkcióját írták le az RNS-molekulák hidrolitikus emésztődésével szemben (30). A DNS-metiláció a vírusok, baktériumok és eukarióták csoportjában is megtalálható epigenetikai módosulás (31,32). Három formáját különböztetjük meg attól függően, hogy melyik bázist érinti a DNS-szállban: 6-metiladenin, 4-metilcitozin és 5-metilcitozin (5mC) (31). Ezek közül a 6-metiladenin és az 5mC bázismódosulatok figyelhetők meg az eukarióták körében, illetve az 5mC az, amely az elmúlt évtizedek kutatásai során a legnagyobb figyelmet kapta (31,33–36). Számos folyamatban játszik fontos szerepet, mint amilyen többek között az imprinting jelenség megvalósítása (37), a kromatinstruktúra és a génexpresszió szabályozása (38), az X kromoszóma inaktiválása (39), illetve a mobilis genetikai elemek aktivitásának szabályozása (40).

Az 5mC humán sejtekben jellemzően a CpG-dinukleotid helyeken fordul elő, tehát egy olyan kovalens módosulás, amely azon citozin nukleobázisok ötödik szénatomját érinti, amelyeket guanin tartalmú nukleotid követ a szekvenciában (33,41). A CpG-gazdag szabályozási egységeket ún. CpG-szigeteknek nevezzük, amelyek a gének promóter, illetve egyéb szabályozó régióiban helyezkednek el. A promóter régiókban elhelyezkedő CpG-szigetek fokozott metilációja az adott gén csendesítéséhez vezet, ami többféleképpen valósulhat meg (3. ábra) (29,38). Az egyik lehetséges mechanizmus esetén, a magas metilációs szint következtében a transzkripció faktorok kötődése gátolt, ezáltal a transzkripció iniciációja elmarad. A másik esetben a metilált citozinokhoz olyan fehérjék kötődnek, amelyek a kromatin kondenzációját előidéző hiszton-módosulatokat képesek létrehozni. Ezzel szemben a CpG-szigetek alacsony mértékű DNS-metilációja vagy annak teljes hiánya lehetővé teszi a gén átíródását (29). CpG-dinukleotidok az intergénikus régiókban is előfordulhatnak, ezáltal a transzpozonok aktivitását is szabályozhatják, ami a genom 17%-át adó LINE-1 (hosszú közbeiktatott szakasz 1, long interspersed nuclear element 1) retrotranszpozon és további 11%-ot adó Alu elemek esetén kiemelt jelentőségű (41). A humán DNS-ben a promóter metiláció mellett megfigyelhető a géntestek metilációja is, amely többnyire pozitív korrelációt mutat az mRNS-expresszióval (42,43).

**A) Nem metilált DNS****B) Metilált DNS****C) Metilált DNS****3. Ábra. A promóter régiókat érintő DNS-metiláció és a génexpresszió kapcsolata.**

A) A promóter szakaszok DNS-metilációjának alacsony szintje vagy teljes hiánya lehetővé teszi a gén kifejeződését. Ezzel szemben a promóter régiók erős metiláltsága a transzkripciós faktorok kötődésének gátlását (B), vagy olyan metil-CpG-kötő fehérjék toborzását idézheti elő, amelyek további fehérjékhez kapcsolódva (például hiszton-deacetilázok) a hisztonok módosításával a kromatin kondenzálódását képesek kiváltani (C). Ezek az adott gén átíródásának gátlását eredményezhetik (44). Az ábra Ling és mtsai. alapján készült, módosítva (29). HDAC: hiszton-deacetiláz, KoRep: transzkripciós korepresszorok, MeCP2: metil-CpG-kötő fehérje 2, TF: transzkripciós faktor.

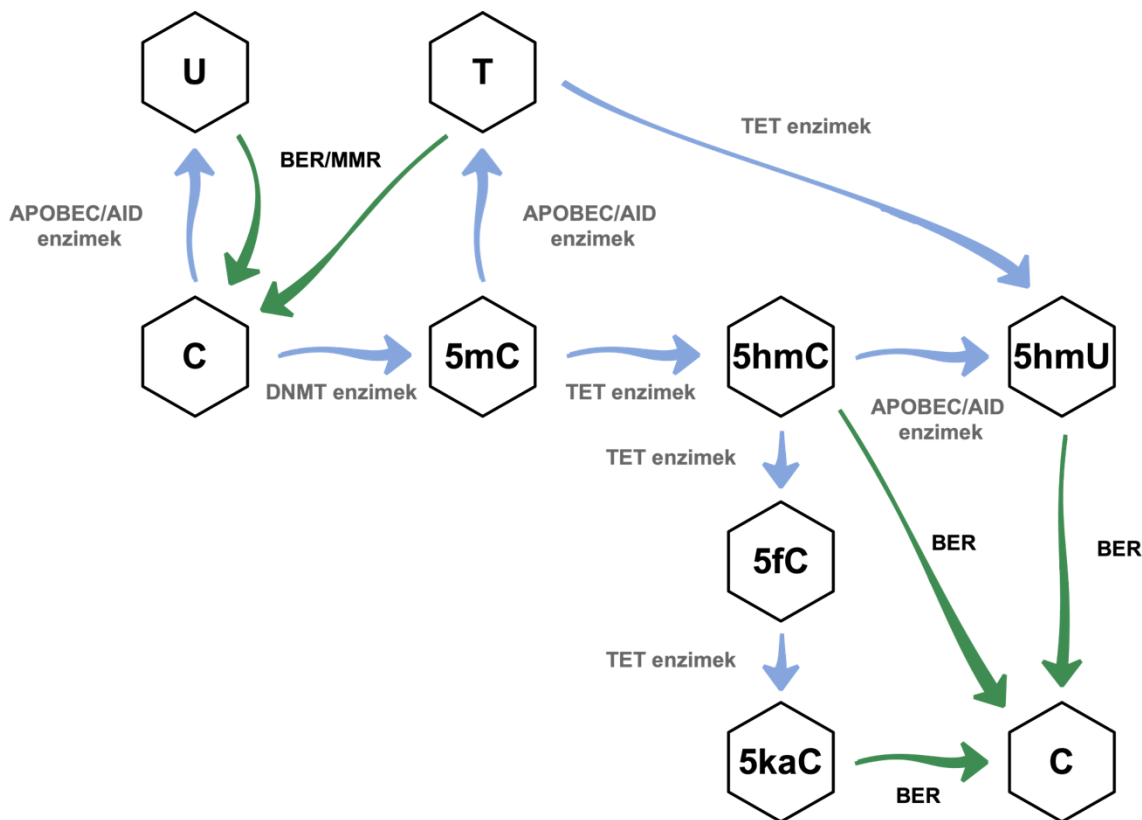
**2.2.3. A DNS-metiláció enzimatis háttere**

A DNS-metiláció egy reverzibilis folyamat, ami a DNS-metilációs mintázat különböző enzimek által végzett, dinamikus változását teszi lehetővé (45). A (citozin-5)-metiltranszferáz enzimek katalizálják a metilcsoport és a citozin ötödik szénatomja közötti kovalens kötés létrejöttét (45). Emlősökben három metiltranszferáz aktivitással bíró enzim különböztethető meg: a *de novo* aktivitású DNS-metiltranszferáz 3A és 3B

(DNMT3A és 3B) (46), illetve a posztreplikatív működésű, DNS-metilációs mintázat fenntartásáért felelős DNS-metiltransferáz 1 (DNMT1) (47).

A metilcsoportok eltávolítása szintén történhet enzimatis reakciók által, de bekövetkezhet spontán módon is. Az enzimek által végzett demetiláció több lépcsőben valósul meg a TET (ten-eleven translocation, tíz-tizenegy transzlokáció) metilcitosin-dioxidázok és az AID/APOBEC (aktivitás-indukált dezamináz/apolipoprotein B mRNS-módosító enzim, katalitikus polipeptidszerű) enzimrendszerek segítségével (4. ábra) (48–52). A TET enzimcsalád első tagjának (TET1) működése során az 5mC-ből 5-hidroxi-metilcitosin (5hmC) jön létre (49), amely további TET enzimek által először 5-formilcitosinná (5fC), majd 5-karboxilcitosinná (5kaC) oxidálódik (48). Ez utóbbi formákat végül a BER (base excision repair, báziskivágásos hibajavítás) típusú DNS-hibajavítási rendszer egyik tagja, a timin-DNS glikoziláz (TDG) enzim képes felismerni és eltávolítani a DNS-ből (53). A szintén demetilációs aktivitással bíró AID/APOBEC enzimrendszer tagjai dezaminázok (50). Katalízisük által citozinból uracil (U) nukelobázisok jönnek létre, így ennek mintájára 5mC-ből timin (T), illetve 5hmC-ből 5-hidroxi-metiluracil (5hmU) alakul ki. A keletkező mutációk szintén hibajavításra kerülnek a BER vagy MMR enzimrendszerek által (50).





**4. ábra. A DNS-metilációs és -demetilációs folyamatok összefoglalása.** A DNS-metiltransferázok (DNMT) katalízisével létrehozott 5-metilcitozin (5mC) demetilációja bekövetkezhet a TET, illetve AID/APOBEC enzimek által, illetve spontán módon is (48–52,54). A TET enzimek működésével az 5mC 5-hidroximetilcitozint követően először 5-formilcitozinná, majd 5-karboxilcitozinná alakul (48,49). Az AID/APOBEC fehérjéken keresztül megvalósuló demetiláció során dezamináció a metilált citozinból timint, a hidroximetilált citozinból pedig 5-hidroximetiluracilt eredményez (50). Emellett ugyanezen enzimszisztéma által citozinból uracil alakulhat ki. A létrejövő timin, uracil és további módosulatok a különböző hibajavító rendszerek segítségével cserélődnek újra citozinná (50,53). 5fC: 5-formilcitozin, 5hmC: 5-hidroximetilcitozin, 5hmU: 5-hidroximetiluracil, 5kaC: 5-karboxilcitozin, 5mC: 5-metilcitozin, C: citozin, T: timin, U: uracil.

A daganatos megbetegedések kapcsán fontos információt hordozhat magában a DNS-metiláció és -demetiláció folyamatának szekvenszifikus működése. Az AID enzimek nagyobb affinitást mutatnak az adenin-guanin-5mC-guanin nukleobázis-tartalmú szekvenszifaszakaszokra (55), míg a DNMT enzimszisztéma esetén specifikusabb

preferenciát még nem azonosítottak a CpG-dinukleotidokon kívül (56). Ellenben vannak olyan fehérjék és nem-kódoló RNS-ek, amelyek az enzimekhez kötődve képesek targetálni azok működését (56–60).

#### 2.2.4. A DNS-metiláció metabolikus alapjai

A DNS-metilációs folyamatokban kulcsfontosságú szerepet tölt be a közvetlen metildonor funkcióval rendelkező S-adenozil-metionin (SAM) molekula (61), amely az ún. egy szénatomos (1C) ciklusban, más néven 1C metabolizmus során jön létre (5. Ábra) (62). Az 1C anyagcsereútban több metabolikus reakciókör kapcsolódik. Központi molekulája az egy szénatomos töredékeket szállító esszenciális vitamin, a folsav (B<sub>9</sub>-vitamin), amelyhez táplálkozás által, főként leveles zöldségek, hüvelyesek, gabonafélék, illetve állati eredetű termékek közül elsősorban a máj fogyasztásával, valamint táplálékkiegészítők alkalmazásával juthatunk hozzá (63). A természetes étrendi folátok poliglutamátlánccal rendelkeznek, amely lehasítása szükséges ahhoz, hogy a folát a sejtekbe juthasson. Ezzel szemben a táplálékkiegészítőkből található folsavhoz monoglutamátcsoporthoz kötődik, amely nem akadályozza a felszívódást (63). A sejtmembrántranszport megvalósulhat receptorok (folát receptor, FR), valamint transzportfehérjék (redukáltfolát-karrier és protonkapcsolt foláttranszporter) működésével (64,65).

A 1C ciklust alkotó, három szorosan kapcsolódó metabolikus útvonal a folátciklus, a metioninciklus és a transzszulfurációs útvonal (66) számos létfontosságú folyamathoz szolgáltatnak prekursor molekulákat (62). A folátciklus a timidin, illetve puringyűrűk létrehozásához biztosít molekularészeket, ami által a nukleinsavak szintézisében tölt be esszenciális szerepet, míg a metioninciklus fontos molekulaterméke a már említett SAM (62,67). A folátciklus enzimkészlete megtalálható a citoplazmában, valamint a mitokondriumban is, viszont a metioninciklus enzimrendszere csak a citoplazmában van jelen, ezáltal a SAM képződése a citoplazmában megy végbe (62).

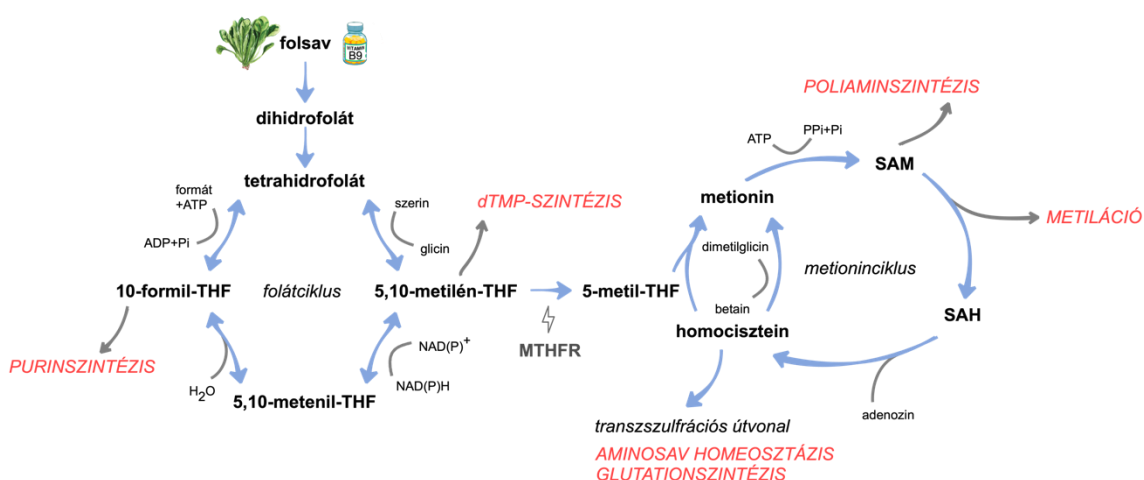
A folsav dihidrofoláton (DHF) keresztül alakul tetrahidrofoláttá (THF) a folátciklusban. A THF egy biológiailag aktív forma, ugyanis ehhez a molekulához képesek kovalens módon kötődni az egy szénatomos töredékek, ezáltal létrehozva az 5,10-metilén-THF-et. Az egy szénatomos töredékek legfőbb forrásai a szerin, a glicin és

a kolin, amelyek közül a szerin és a glicin azok a molekulák, amelyek közvetlenül képesek egy szénatomos töredéket a folátciklusba juttatni. Az 5,10-metilén-THF különböző oxidációs állapotaiban (10-formil-THF, vagy 5-metil-THF) kapcsolódik a nukleinsavszintézishez, vagy a metioninciklushoz (62).

A timidilát-szintáz enzim az 5,10-metilén-THF metilcsoportját dezoxiuridin-monofoszfátra (dUMP) helyezi át dezoxitimidin-monofoszfátot (dTMP) hozva létre (68). A 10-formil-THF a purinvázak szintéziséhez nélkülözhetetlen, ez a kapcsolódó bioszintetikus útvonal igényli a legtöbb folátot az 1C ciklusban (69,70). A kulcsfontosságú 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz enzim (MTHFR) katalízise által 5,10-metilén-THF-ből 5-metil-THF jön létre. Az 5-metil-THF köti össze a folát- és a metioninciklust. Az *MTHFR* gén olyan mutációi, amelyek a fehérje aktivitásának csökkenéséhez vezetnek, befolyásolhatják a SAM szintézisét, ezáltal a további metilációs folyamatokat (71,72). A gén két leggyakoribb ismert polimorfizmusa a C677T (73) és az A1298C (74,75). A C677T heterozigóta mutáns formában az enzim aktivitásának 20-30%-os, homozigóta formában 50-60%-os csökkenését eredményezi (73,76,77), míg az A1298C mutáció heterozigótaság és homozigótaság esetén is 40-50%-kal alacsonyabb mértékű enzimműködést idéz elő (75,78). A két polimorfizmus heterozigóta formában történő egyidejű jelenléte hozzávetőlegesen az MTHFR enzim 40%-os aktivitás csökkenéséhez vezet (78,79).

A metioninciklus első lépéseként az 5-metil-THF-ről a metilcsoport a homocisztein molekulára kerül, amelyből így metionin keletkezik. A metioninból - adenzin kötődésével - kialakul az univerzális metildonor molekula, a SAM, amely az epigenetikai folyamatok mellett részt vesz például a foszfatidilkolin vagy a poliaminok szintézisében is. A metilcsoport átadását követően a SAM S-adenozil-homociszteinné (SAH) alakul, és végezetül homociszteinné és adenzilcsoporttá hidrolizálódik (62). A metionin regenerációja történhet homociszteinekből a már fentebb leírt folsavfüggő módon, de folsavtól függetlenül is megfigyelhető, amikor a metilcsoport betain molekuláról kerül a homociszteinekre (62). Továbbá a homociszteinszint irreverzibilis szabályozója a transzszulfurációs útvonal is, amely során cisztein jön létre. Ezáltal kapcsolódik az 1C metabolizmus az aminosav homeosztázisához, illetve a glutationszintézishez is, amely fontos redukáló kapacitással bír a reaktív oxigéngyökökkel szemben (80).

A homociszteinszintet szabályozó celluláris folyamatok nagy jelentőséggel bírnak, ugyanis számos betegség magasabb kockázata köthető a homocisztein megemelkedett mennyiségéhez, különösképpen az életkor előrehaladtával. Ilyen kóros állapotok például a különböző neurodegeneratív és kardiovaszkuláris megbetegedések, valamint a makuladegeneráció (81,82). A homociszteinhez köthető anyagcsere-folyamatokban bekövetkező zavarok negatívan érinthetik az 1C metabolizmust, tehát a nukleotid- és SAM-szintézist is. Ebből kifolyólag hozzájárulhatnak különböző mutációk és epimutációk létrejöttéhez, ezáltal rákos folyamatok kialakulásához is (83).



**5. Ábra. Az egy szénatomos metabolizmus vázlatja.** Az egy szénatomos (1C) ciklust három fő folyamat, a folátciklus, a metioninciklus, illetve a transzszulfurációs útvonal alkotja, központi molekulája a folsav. Az 1C metabolizmus intermedier molekulái számos bioszintetikus útvonal prekursoraként szolgálnak, így részt vesznek a purin nukleotidok, a dTMP, a glutation, vagy a poliaminok szintézisében. Emellett szerepet játszanak az aminosavak homeosztázisának fenntartásában és az univerzális metildonor molekula, az S-adenozil-metionin (SAM) létrehozásában is. A folsav dihidrofoláton (DHF) keresztül alakul a biológiailag aktív tetrahidrofolát (THF) molekulává, ami metilcsoport kötődése után 5,10-metilén-THF-fé, vagy formát kapcsolódásával a 10-formil-THF-fé változik. Az 5,10-metenil-THF molekulán keresztül 5,10-metilén-THF-ből szintén 10-formil-THF jöhet létre. A purinvázak szintézise a 10-formil-THF-et hasznosítja, míg az 5,10-metilén-THF metilcsoportot biztosít a dTMP előállításához, illetve az MTHFR enzim katalízisének következtében 5-metil-THF molekulává alakulhat. Az 5-metil-THF oxidációs forma képes a metioninciklushoz kapcsolódni,

amelyben metilcsoportjának homociszteinhez való kötődése metionint hoz létre. A metionin betain által is regenerálódhat. Metioninból ATP által kialakul a SAM, amely a metilációs reakciókat követően S-adenozil-homociszteinen (SAH) keresztül homociszteinné és adenzinná hidrolizál. A homocisztein újrametilálódhat, vagy a transzszulfurációs útvonalon keresztül ciszteinné alakulhat, illetve részt vehet a glutation szintézisében (62). 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, MTHFR: 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, SAH: S-adenozil-homocisztein, SAM: S-adenozil-metionin, THF: tetrahidrofolát.

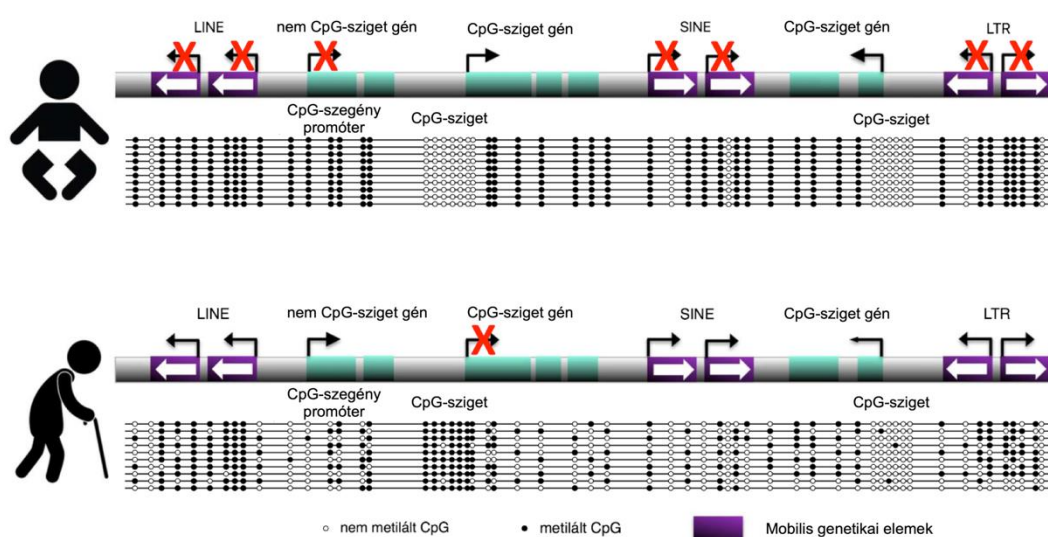
Számos kutatás fókuszában áll a CRC kialakulásának valószínűsége és a folsavszint közötti összefüggés elemzése. Eredményeik alapján fordított korreláció figyelhető meg a bevitt folsavmennyiség és a vastagbél-daganatok kialakulásának kockázata között (84–89). Ezen tanulmányok közül Schernhammer és mtsai. feltételezik a folátmennyiség globális DNS-metilációs szinten keresztül kifejtett hatását a CRC megjelenésére (89). Vizsgálataik során a napi  $\geq 400$   $\mu\text{g}$  és  $< 200$   $\mu\text{g}$  folátbevitel összehasonlításában, a kolorektális tumorok kialakulásának relatív kockázata alacsonyabbnak adódott magasabb DNS-metilációs szinttel rendelkező daganatok esetén a nagyobb mennyiségű folátbevitel mellett (89). Továbbá kiemelten fontos megemlíteni, hogy a folsavpótlás eltérő hatást válthat ki ép szöveten, illetve már fennálló rákos kórfolyamat esetén. Irodalmi adatok alapján a megfelelő folsavszint az egészséges folyamatok fenntartásához nélkülözhetetlen, míg meglévő daganat esetén a folsav a tumor progresszióját idézheti elő (90).

### **2.2.5. A DNS-metilációs mintázat jellegzetes megváltozása az öregedés folyamata és a daganatok kialakulása során**

A sejtspecifikus DNS-metilációs mintázatra hatást gyakorolnak a DNMT és demetiláz enzimek, transzkripciós faktorok, hosszú nem-kódoló RNS-ek, továbbá az 1C ciklus enzimszisztémájának megfelelő működése, illetve a metildonor molekulák elérhetősége (91). Bizonyos kutatások jelátviteli útvonalak szerepét is leírták a DNS-metilációs mintázat módosulásában, mint például a Ras-jelátvitelét adrenokortikális

sejtvonalakban (92), valamint a Wnt-szignalizációs útvonal kapcsolatát a DNMT1 enzim expressziójával összefüggésben vastagbél-daganatos HT-29 sejtvonalban (93). Továbbá a DNS-metilációs mintázatot erősen befolyásolja annak hibás másolása sejtosztódáskor (94). Az öregedés folyamata során bekövetkező epigenetikai eltérések felhalmozódását, valamint sejtosztódások között történő fenntartását nevezzük epigenetikai sodródásnak (94–97). A DNS-metilációs mintázat módosulását az életkor előrehaladtával számos szövettípusban (98), köztük a vastagbél kriptáit alkotó őssejtek esetén is leírták (99).

Ezek az öregedéshez köthető (age-related, A-típusú) metilációs változások bizonyos metilált szakaszok demetilációját és nem metilált régiók metilációját okozzák (100). Tehát a fiatal korban jellemző DNS-metilációs mintázatot felülírja a globális hipometiláció és a lokális hipermetiláció jelensége (6. Ábra) (101). Az előbbi esetben az intergénikus régiók, transzpozázibilis elemek - például LINE-, SINE- (short interspersed nuclear element, rövid közbeiktatott szakasz), LTR- (long terminal repeats, hosszú terminális ismétlődések) szakaszok - eredendően nagymértékű DNS-metilációjának csökkenése figyelhető meg, párhuzamosan az eukromatin régiók arányának megnövekedésével. Lokális hipermetiláció során a korábban expresszálandó gének promóter szakaszainak metilálatlan CpG-szigetei erősen metilálttá válnak (101). Steve Horvath 353 CpG-dinukleotid metilációs és demetilációs eseményeit vizsgálta különböző szövetekben, és ezek alapján megalkotta az ún. epigenetikai órát (102), amely az adott személy biológiai korának, várható élethosszának, illetve különböző betegségekre való hajlamának becslésére alkalmas (103,104). Az egészséges öregedésre jellemző DNS-metilációs eltérések megfigyelhetők bizonyos kóros folyamatokban is, mint például Alzheimer-kórban (105), kardiovaszkuláris és rákos megbetegedésekben (106), illetve hosszan fennálló gyulladás esetén, így gyulladásozó bélbetegségekben is (107,108).



**6. Ábra. DNS-metilációs mintázat megváltozása az életkor előrehaladtával.** Fiatal korban a DNS-metiláció által szabályozott, CpG-szigetekben gazdag gének promóterei nem metiláltak, az átíródás biztosított. Ezzel szemben a genom szinten jelenlévő erős metiláció a heterokromatin struktúra létrejöttét indukálja, így az intergénikus régiókban elhelyezkedő mobilis genetikai elemek gátlása valósul meg (fent). Az öregedés folyamata során ezek a mintázatok megváltoznak. Bizonyos korábban transzkriptálódó gének CpG-szigetben gazdag promóter régiói hipermetilálódnak, ami az expresszió gátlásához vezet, míg globálisan hipometiláció alakul ki. Ez a heterokromatin régiók arányának csökkenését idézi elő, valamint lehetővé teszi a transzpozázibilis szakaszok áthelyeződését, hozzájárulva a genetikai instabilitás kialakulásához (101). LINE: long interspersed nuclear element, hosszú közbeiktatott szakasz; LTR: long terminal repeats, hosszú terminális ismétlődések; SINE: short interspersed nuclear element, rövid közbeiktatott szakasz. Az ábra forrása: Pal és Tyler (101).

A rákos megbetegedések során tapasztalható DNS-metilációs változások (cancer-related, C-típusú) hasonlítanak az öregedés folyamata során leírtakra, viszont kortól függetlenül is létrejöhetnek (109). Az A-típusú DNS-metilációs változások által érintett gének körülbelül 50%-ban mutatnak átfedést a vastagbélrákos megbetegedések során érintett génekkel (17). A C-típusú DNS-metilációs eltérések esetén megfigyelhető lokális hipermetiláció főként a tumorszuppresszor gének promótereit érinti (110). Emellett a globális DNS-hipometiláció jelensége által - az A-típusú változásokhoz hasonlóan - a mobilis genetikai elemek kikerülnek a DNS-metiláció szabályozása alól (101).

## 2.2.6. A globális DNS-hipometiláció jelensége vastagbél-daganatokban

A globális DNS-hipometiláció, más néven genomszintű DNS-hipometiláció az elsőként leírt epigenetikai molekuláris változás vastagbél-tumorokban (109,111). A hipometiláció teljes genom szinten értelmezendő, ugyanis legfőképp az igen nagy kópiaszámban jelenlévő mobilis genetikai elemek szekvenciáit érinti (112). Ilyen globális metilációcsökkenés által érintett, jelentős kópiaszámmal rendelkező transzpozabilis elem például a LINE-1 retrotranszpozon, amelynek szekvenciái - ahogy már korábban említettük - a genom 17%-át teszik ki (113), illetve az Alu elemek, amelyek a DNS-szál 11%-át adják (114,115). További 8%-ot jelentő HERV- (human endogenous retroviruses, humán endogén retrovírusok) szekvenciák H és K alcsoportjaiban szintén demetilációt írtak le vastagbél-daganatokban (116). Globális DNS-hipometiláció során a mobilis genetikai elemek kikerülnek a metiláció általi szabályozás alól, amely reaktiválódásukhoz vezet, így véletlenszerű áthelyeződésükkel genetikai instabilitást idézhetnek elő (117–119).

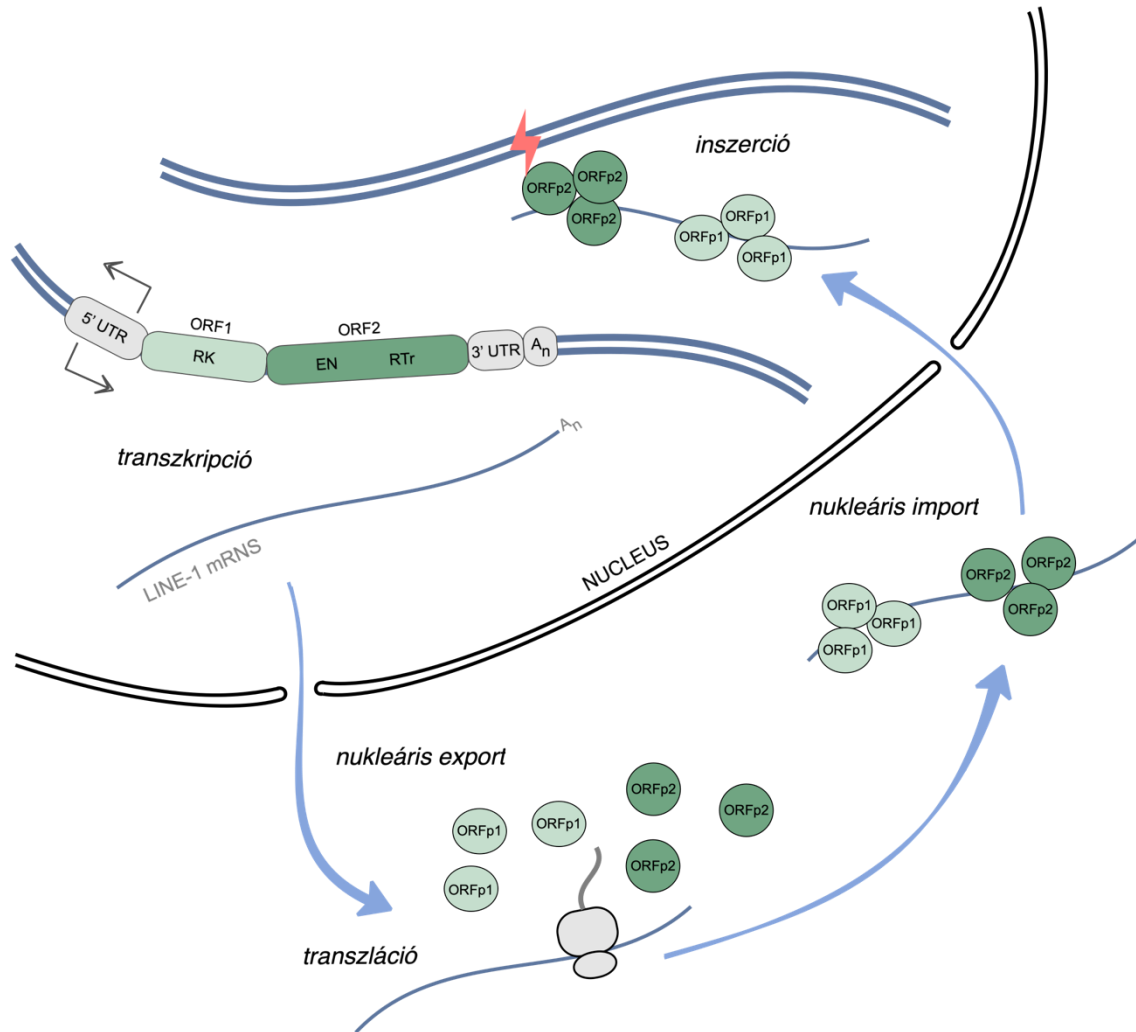
### 2.2.6.1. A LINE-1 retrotranszpozonok jelentősége

A LINE-1 retrotranszpozonok aktiválódását az életkor előrehaladtával is leírták, továbbá számos ráktípus esetén megfigyelhető molekuláris hajtóerő a tumorprogresszió során (115,120). Vastagbél-daganatokban már adenómákban is detektálható, ezáltal potenciális biomarker a rákmegelőző állapotok felismerésére (121,122).

A LINE-1 retrotranszpozon az egyik legaktívabban kutatott mobilis genetikai elem, amely hosszú evolúciós múltra tekint vissza. Szekvenciái a legtöbb eukarióta organizmusban megtalálhatóak, emlősökben a legnagyobb mennyiségben (123). Kópiái hozzávetőlegesen ötszáz ezer másolatban fordulnak elő a humán DNS-ben. A másolatok közül a legtöbb inaktiválódott trunkált forma, így a genomban csak mintegy 80 szekvenciát tartanak működőképesnek (124). Az ilyen, inszercióra képes szakaszok megközelítőleg hat kilobázispár hosszúságúak, 5' régiójukban két promotérszakasszal rendelkeznek (125,126). A szensz irányban fekvő promoterről átíródó mRNS-ek bicisztronikusak, az ORFp1 és ORFp2 fehérjéket kódolják (127). Az ezzel ellentétes irányba mutató antiszensz promóter a szomszédos gének átírását teszi lehetővé (125,126).



A szensz irányban kódolt ORFp1 és ORFp2 fehérjék által történik a LINE-1 szekvenciák áthelyeződése (127). Az előbbi RNS-kötő (128), míg az utóbbi endonukleáz (129) és reverztranszkriptáz (130) funkcióval bír. Az aktív LINE-1 kópiák áthelyeződése az ún. “copy and paste” mechanizmus által történik (7. Ábra). A mechanizmus első lépéseként az átíró mRNS-ről fehérjék szintetizálódnak a citoplazmában, ahonnan a LINE-1 mRNS molekula az ORFp1 által visszajut a sejtmagba. Az ORFp2 reverztranszkriptáz aktivitásával az mRNS templátról DNS-t szintetizál, a szintén ORFp2 által hasított DNS-pozícióban (120). A létrejövő kettőstörés kijavítása, illetve a komplementer DNS-szál szintézise a sejt hibajavító apparátusa által történhet (115).



**7. Ábra. A LINE-1 retrotranszpozonok áthelyeződésének folyamata.** A LINE-1 szekvencia 5' régiójában két promóter található. A szensz irányban elhelyezkedő promoterről átíródó mRNS-ről az RNS-kötő ORFp1 és endonukleáz, illetve reverztranszkriptáz funkciójú ORFp2 fehérjék transzlálódnak (127–130). Ezek, az őket kódoló mRNS-sel ribonukleoprotein komplexet alkotva visszaszállítódnak a sejtmagba, ahol véletlenszerű pozícióban megtörténik az inszerció. Az ORFp2 endonukleáz aktivitásával kettőstörést hoz létre a DNS-ben, majd reverztranszkriptáz funkciója által - az mRNS-t használva templátként - DNS-szálat szintetizál (120). A kettőstörés kijavítását, illetve a komplementer DNS elkészítését a sejt hibajavító rendszere végzi. A transzpozíció ilyen típusát “copy and paste” mechanizmusnak nevezzük (115). EN: endonukleáz, RK: RNS-kötő, RTr: reverztranszkriptáz, UTR: untranslated region, nem transzlálódó régió.

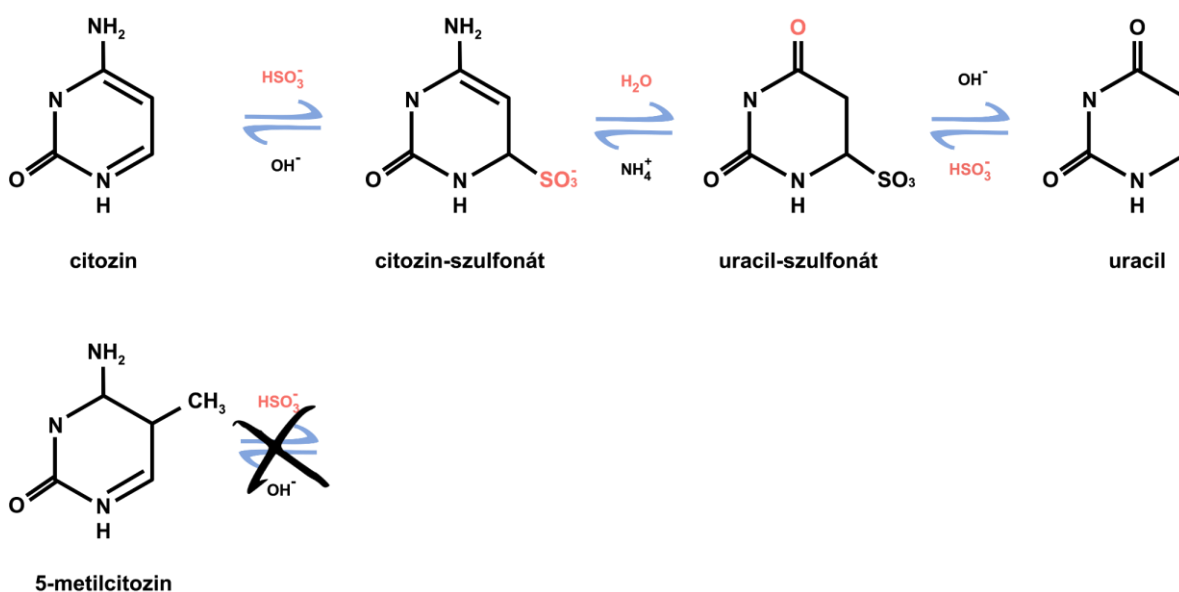
A LINE-1 szakaszok autonóm működésű mobilis genetikai elemekként önmagukban áthelyeződésre képesek, de felelősek a SINE elemek közé tartozó, szintén nagy kópiaszámmal rendelkező Alu szekvenciák transzpozíciójáért is (115,131). A genetikai instabilitás a reaktiválódás következtében felhalmozódó mutációk miatt jön létre. A véletlenszerű áthelyeződés az érintett célszekvencia módosulását, így az adott gén kifejeződésének zavarát eredményezi, amely onkogén aktiválódás, vagy tumorszuppresszor inaktiválódás esetén a tumorok kialakulásához vezethet (115). Ilyen eseményre példa az APC tumorszuppresszor gén mutációja, amelyet egy korábbi tanulmányban 150 vastagbélrákos minta vizsgálata során egy esetben tapasztaltak (132). További mutációkat eredményezhet az ORFp2 okozta kettőstörés (133,134), illetve az áthelyeződés következtében megvalósuló kromoszóma átrendeződések, mint deléciók (135), inverziók (136), transzlokációk (137), illetve az ugráló szekvenciákkal szomszédos régiók igen gyakori áthelyeződése is, amelyet LINE-1-mediált transzdukciónak nevezünk (138,139). Mindemellett, az egyre növekvő kópiaszám a nem egyenlő rekombinációk valószínűségét is növelheti további duplikációs, deléciós esemény kialakulásához vezetve (140,141). A vastagbélragasztatok progressziója során az antiszensz promóter hipometilációja következtében több protoonkogén aktivációját is leírták (126).

A LINE-1 retrotranszpozonok működésével járó genombeli változások tehát magyarázzák a globális DNS-metiláció szerepének fontosságát, valamint a globális DNS-metilációs szint mérésének jelentőségét.

#### ***2.2.6.2. A globális DNS-metilációs mintázatot vizsgáló módszerek***

A DNS-metiláció jelentős biológiai relevanciájának feltárásával párhuzamosan számos módszert dolgoztak ki a lókuszszerkezet-specifikus, illetve a globális szintjének mérésére. Ezen módszerek alapjaként szolgálhat az analizálandó szövet-, vagy sejtminta immunfestések esetén (142), valamint a különböző mintatípusokból izolált DNS-minta, amelynek elemzésére számos metodika érhető el. Szekvenciájában nem módosított DNS-t vizsgálnak például a folyadékkromatográfiával kapcsolt technikák, az ELISA módszerek, vagy egy harmadik generációs szekvenálás, a nanopórusos szekvenálás (143,144). Gélelektroforézis-, második generációs szekvenálás-, illetve microarray-alapú technikák alkalmazását megelőzően a DNS-minták előkezelése szükséges, például

metilációs-specifikus endonukleázokkal történő emésztéssel, vagy immunprecipitációval (143). Továbbá számos metodika épül a DNS-minták ún. biszulfitkonvertálására. Biszulfitkonverzió során szódium-biszulfit jelenlétében a metilált citozinok helyén metilátlan citozin marad, míg a nem metilált citozinok uracillá alakulnak, tehát a DNS-szekvencia módosul (8. Ábra) (145). A biszulfitkonverziót követő amplifikáció során a létrejött uraciltartalmú nukleotidok helyére timintartalmúak épülnek be, így a kapott DNS minták különböző technikákkal - mint például PCR, microarray, valamint szekvenálás - továbbanalizálhatóak (146).



**8. Ábra. A biszulfitkonverzió molekuláris lépései.** Biszulfitkonverzió során szódium-biszulfit jelenlétében a metilált citozinok helyén metilátlan citozin marad, míg a nem metilált citozinok uracillá alakulnak. A nem metilált citozinok szulfonálást követően dezaminálódnak, így deszulfonálás után uracil nukleobázisok maradnak vissza. Metilált citozinok nem konvertálódnak, citozinként maradnak vissza a folyamat végén (145).

A genomszintű DNS-metiláció elemzésének aranystandard módszere az UV-detekcióval kapcsolt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC-UV, high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet), illetve ennek alternatívája a tandem tömegspektrometriával kombinált folyadékkromatográfia (LC-MS/MS, Liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry). Az előbbi módszer 3-10 µg, az utóbbi 50-100 ng módosítatlan input DNS-t igényel, amelynek hidrolízisét követően folyadékkromatográfia által kerülnek a nukleozidok elválasztásra,

majd detektálásra. Végezetül meghatározható a metilált citozinok aránya a DNS teljes citozintartalmához viszonyítva (144,147). Azonban ezen módszerek alkalmazásához szükséges szakértelem, berendezés és eszközök nem elérhetőek széles körben.

A napjainkban legelterjedtebben alkalmazott globális DNS-metilációt analizáló módszerek szekvenáláson alapulnak. A legtöbb ilyen metodika előtt a DNS előkezelése szükséges például restrikciós enzimekkel, affinitásalapú dúsítással, vagy biszulfitkonverzióval. Endonukleázok általi kezelést alkalmaznak például MRE-szekvenálás (methylation-sensitive restriction enzyme sequencing, metilációszenzitív emésztést követő szekvenálás) esetén. Affinitás dúsításra épülő technika például a MeDIP-szekvenálás (methylated DNA immunoprecipitation sequencing, metilált DNS-immunprecipitáláson alapuló szekvenálás), amely során az újgenerációs szekvenálást a metilált CpG-kben gazdag régiók 5mC-specifikus monoklonális antitestekkel történő dúsítása előzi meg. Biszulfitkonverziót igénylő szekvenálási technikák az RRBS (reduced representation bisulfite sequencing, csökkentett reprezentáltságú biszulfitszekvenálás), a teljes genom biszulfitszekvenálás, vagy a piroszekvenálás (143). Ezek közül az utóbbi a repetitív elemek - mint például LINE-1, Alu elemek, Satellite 2 - metiláltsági szintjének meghatározásával becsli a globális DNS-metiláció mértékét (148).

#### 2.2.6.2.1. A LINE-1 biszulfit-piroszekvenálás

A LINE-1 szekvenciák metiláltságának mértéke korrelációt mutat a teljes genom metiláltságának szintjével (149), ezáltal számos ismert genomszintű DNS-metilációt vizsgáló módszer célozza a LINE-1 retrotranszpozon kópiák elemzését. Ilyen módszerek többek között a metilációszenzitív restrikció, a kombinált biszulfit-restrikciós analízis (COBRA, combined bisulfite restriction analysis), a kvantitatív valósídejű PCR-alapú MethyLight, a metilációspecifikus PCR (MSP), valamint a piroszekvenálás (150). A biszulfit-piroszekvenálás eredményei mutatják a legkisebb varianciát, illetve a legmagasabb jel-zaj arányt az imént említett technikákhoz viszonyítva (151). Továbbá a LINE-1 biszulfit-piroszekvenálás egy költséghatékony, megbízható és viszonylag alacsony kiindulási DNS-mennyiséget igénylő módszer (144,151), amely által kapott eredmények korrelálnak leginkább a korábban említett aranystandard technikákkal mért globális DNS-metilációs értékekkel (144). Ezeknek a jellemzőknek köszönhetően a

LINE-1 biszulfít-piroszekvenálás világszerte alkalmazott globális DNS-metiláció becslési módszerré vált (152–158). A biszulfítkonverziót követően a LINE-1 szakaszok promóter régiójának amplifikációja biszulfítspecifikus PCR segítségével történik. Ennek során a primerek szekvenciái a konvertált nukleotidokkal komplementerek, illetve a primerek olyan DNS-szakaszokra vannak tervezve, amelyek nem tartalmazzak CpG-helyet (159). A PCR után a kapott amplikonok piroszekvenálása a következő lépés. A szekvenálni kívánt szál izolálását biotinilált PCR primer teszi lehetővé. Piroszekvenálás során az ismert sorrendben adagolt nukleotidok beépülése egy kapcsolt fényreakció által detektálható. A beépüléskor felszabaduló pirofoszfátot az ATP-szulfuriláz enzim ATP-vé képes alakítani. A létrejövő ATP-t felhasználva a luciferáz enzim luciferinből oxiluciferint hoz létre, ami fény felvillanásával jár. Amennyiben a szekvencia több ugyanolyan nukleotidot tartalmaz egymás után, a detektált fény intenzitásának növekedése tapasztalható. A szekvenátor által adagolt nukleotidok módosított ATP-t tartalmaznak, amit a luciferáz nem képes hasznosítani (160). A piroszekvenálási reakciót követően az adott CpG-helyre vonatkozó metilációs százalékot a beépült timinek és citozinok arányából lehet kiszámolni az erre alkalmas szoftver segítségével (161).

A LINE-1 retrotranszpozon fentebb említett biológiai jelentősége, illetve a metiláltsági szintjét becslő biszulfít-piroszekvenálás előnyeinek kapcsán több kutatás is foglalkozott a módszer pontosságának elemzésével vastagbél formalinfixált, paraffinba ágyazott szövetmintákban, fehérvérsejtekben és vérplazmamintákban (151,155,162). Az ilyen típusú átfogó analízisek olyan metodikai és biológiai faktorokról, amelyek befolyásolhatják a kapott LINE-1 metilációs eredményeket nagy jelentőséggel rendelkeznek a tudományos és klinikai célú vizsgálatok területén. Utóbbi esetben különösen fontosak a vérminták elemzése, amelyek minimálisan invazív módon nyerhetőek például rutin vérvétel során, és a bennük található sejten kívüli szabad DNS (skDNS) -frakció potenciális tárgya lehet a különböző betegségekre specifikus biomarkerek detektálásának (163).

### **2.2.7. A sejten kívüli szabad DNS jellemzése és diagnosztikai jelentősége**

Az skDNS és egyéb extracelluláris nukleinsavak vérplazmából történő kimutatását először Mandel és Mateis publikálta 1948-ban (164). A DNS véráramba

jutása feltételezhetően két fő mechanizmus mentén, sejthalál (apoptózis, nekrozis), illetve aktív szekréció által történik. Az skDNS-molekulák többféle formában vannak jelen a véráramban. Megjelenésük szerint lehetnek duplaszálúak, egyszálúak, mitokondriális eredetűek, rövid extrakromoszomális szakaszok, valamint virális, bakteriális, illetve táplálékból származó DNS-fragmentumok (165). Megtalálhatóak önállóan, nukleoszómák részeként, szállítófehérjékhez kötve, extracelluláris vezikulák felszínén, illetve azok lumenében is (166,167).

Az skDNS és rákos kórfolyamatok kapcsolatát 1977-ben közölték először. Megfigyelték, hogy az skDNS egészséges, illetve jóindulatú daganatokkal rendelkező személyekhez képest megnövekedett mennyiségben van jelen a rákos betegek vérplazmájában, továbbá, hogy a metasztatikus tumorok esetén ez a szint emelkedik az áttétet nem adó daganatokhoz képest (168). Az 1980-as években kimutatták ezen skDNS-fragmentumok neoplasztikus eredetét (169). Mára már jól ismert, hogy a tumorszövetből véráramba kerülő DNS hordozza a tumorra jellemző mutációkat és epimutációkat, így lehetővé téve azok folyadékbiopsziákból történő detektálását (163).

#### **2.2.7.1. A DNS-metilációs eltérések megjelenése folyadékbiopsziában**

A folyadékbiopsziák elemzésére napjainkban egyre nagyobb hangsúly helyeződik, ugyanis a kevésbé invazív beavatkozással történő vizsgálatok alkalmazása növelheti a páciensek szűrővizsgálatokon való részvételi arányát, ami a daganatos kórfolyamatok korai, akár rákmegelőző állapotban történő felismeréséhez vezethet. A folyadékbiopszia a vizelet, a vér, a cerebrospinális folyadék és a nyál mintatípusok gyűjtőfogalma, amelyekből izolált skDNS, exoszómák, keringő daganatsejtek, fehérjék, metabolitok, valamint RNS-molekulák szolgálhatnak kutatási célpontként a daganatos megbetegedések szűrése, diagnosztikája, továbbá a műtétet követő időszak, illetve a terápiás válasz utánkövetése során (163).

Az elmúlt évtizedekben számos vastagbélrák-specifikus mutációt és DNS-metilációs eltérést írtak le kezdetekben kolorektális szöveti mintákból, majd vérmintából izolált skDNS-frakciókban. Ilyen szövetmintából detektált megváltozott DNS-metilációval rendelkező gének például a *TIMP3* (170), *IRF8* (170), *CDKN2A* (171), *SFRP1* (172–175), *SFRP2* (172–175). Ezek közül a *CDKN2A* (176), *SFRP1* (177), *SFRP2* (177),

továbbá a *SDC2* (177), *PRIMA1* (177) és *SEPT9* (178,179) vérplazmából is kimutatható hipermetilált gének. Az Európai Unió számos országában már alkalmazott, FDA-engedéllyel (Food and Drug Administration) rendelkező Epi ProColon 2.0 szűrőteszt a *SEPT9* gén promóterének metiláltsági szintjét becsli (180). A munkacsoportunk által is vizsgált teszt 65-75% érzékenységgel és 80-95% specificitással képes elkülöníteni egymástól a CRC-s és egészséges mintákat (179,181). Emellett számos olyan gént azonosítottak már, amelyek ígéretes biomarkerek lehetnek a jövőben a további nagy esetszámú, validáló analízisek elvégzése esetén. Roperch és mtsai. által vizsgált 3 gént (*NPY*, *PENK*, *WIFI*) kombináló mutációs panel 87% érzékenységgel és 80% specificitással választja el a karcinóma mintákat az egészséges személyektől gyűjtött vérmintáktól (182). Zhang és mtsai. két már ismert markergént (*C9orf50* és *TWIST1*) egészítették ki további kettővel (*KCNJ12* és *ZNF132*) elemzéseik során 80% specificitás és 97% szenzitivitás értékeket elérve (183). Barták és mtsai. által leírt négy gén (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, *PRIMA1*) 89,2% érzékenységgel és 86,5% specificitással különítette el az adenóma mintákat az egészségestől, míg 91,5% szenzitivitás és 97,3% specificitás értékekkel választotta el a karcinómás plazmákat a nem tumorosoktól (177).

A folyadékbiopsziák rutinvizsgálatokban történő alkalmazása során elengedhetetlen a mérések reprodukálhatósága. Az skDNS-ben megjelenő tumorokra specifikus markerek sikeres detekcióját nehezítheti a perifériás vörsejtek lízise következtében felszabaduló genomiális DNS jelenléte (184,185). Ennek megelőzésére a sejtek lízisét gátló ágenseket tartalmazó vérvételi csövek kerültek fejlesztésre (186). Egy friss tanulmány a DNS-metilációs mintázat reprodukálható mérését írta le a különböző tartósító csövek használatát követően (186), viszont nem elhanyagolható, hogy bizonyos kutatások ezen tartósítószer DNS-metilációt módosító hatását tapasztalták (187–189), így e jelenséget az alkalmazott gyűjtőcsövek, a használt metodika és az analizált marker függvényében mindig érdemes megvizsgálni.



### 3. Célkitűzések

A vastagbélrákos kórfolyamatok egyik korai molekuláris eseménye a globális DNS-metilációs szint csökkenése, és ezzel összefüggésben a genetikai instabilitás kialakulása. Így célul tűztem ki a genom szintű DNS-metilációs mintázatok megváltozásának, valamint a tapasztalt eltérések lehetséges kialakulási okainak vizsgálatát. A vérplazma skDNS-frakciójában megjelenő daganatspecifikus mutációs és metilációs eltérések potenciális biomarkerként szolgálhatnak, és hozzájárulhatnak a tumorok korai felismeréséhez. Tehát PhD-munkám további fontos részét képezte a globális DNS-metilációs eltérések elemzése vérmintákban. Végezetül a doktori kutatásom során alkalmazott globális DNS-metiláció becslési módszer, a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás eredményeit potenciálisan befolyásoló metodikai tényezők analizését végeztem el. Ezáltal terveztem hozzájárulni az eredmények reprodukálhatóságának növeléséhez mind kutatási, mind esetleges klinikai alkalmazási területeken.

PhD-munkám során célom volt a következő vizsgálatok elvégzése:

1. A globális DNS-metilációs mintázat elemzése vastagbéliszöveti mintákban a kolorektális daganatok progressziója során és gyulladásos bélbetegségekben;
2. A genom szintű DNS-metilációs eltérések megjelenésének vizsgálata egészséges, vastagbél-adenómás és vastagbélrákos páciensektől, valamint gyulladásos bélbetegségekben szenvedő személyektől gyűjtött plazmamintákban;
3. A globális DNS-metilációs változások lehetséges kialakulási okainak analízise vastagbéliszöveti mintákban transzkripció, valamint anyagcsereszinten;
4. A globális DNS-metiláció szintjét becsülő LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás módszerét befolyásoló metodikai tényezők elemzése kolorektális szöveti biopsziákban és vérmintákban. Az analízis a következő szempontokat foglalta magában:
  - az alkalmazott piroszekvenáló kit által vizsgált 3 CpG-hely szeparált, illetve együttes elemzése;
  - eltérő kolorektális szövetminta-gyűjtési technikák;

- különböző szövetfixáló módszerek;
- vastagbéliszöveti biopsziákból izolált DNS tárolása;
- hagyományos K3EDTA, valamint skDNS-frakció tartósítására szolgáló vérvételi csövek alkalmazása;
- vérminták tárolási időtartama és tárolási hőmérséklete;
- páciensek életkora és neme.

## 4. Módszerek

### 4.1. Betegek és minták

Kutatásunkat humán vastagbéliszöveti, perifériás vérsejteket tartalmazó buffy coat és vérplazma-mintákon végeztük. A minták gyűjtése a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinikán, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, illetve Belgyógyászati és Onkológiai Klinikán történt a Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyével (14383-2/2017/EKU). A páciensek - miután teljes körű tájékoztatást kaptak a vizsgálatokról - a TUKEB által jóváhagyott beleegyező nyilatkozatot írtak alá a minták kutatási célra való felhasználásához. A biopsziákat szakértő patológusok osztályozták, a rákos minták stádiumbesorolása Dukes-féle, Astler és Coller által módosított rendszer alapján történt. Analízisünkben minden olyan pácienszt kizártunk, akiknek vastagbél-daganaton kívül egyéb tumoruk is volt, illetve kemo- vagy sugárterápiában részesültek. Az elemzett mintaszámokat a 2. táblázat tartalmazza, továbbá a páciensek klinikopatológiai, valamint demográfiai adatait a függelék F1., F2., F3., F4. táblázatában foglaltuk össze.

**2. Táblázat. PhD-munkám során végzett vizsgálatok mintaszámai (n).** N: egészséges, AD: kolorektális adenóma, AD-NAT: adenóma melletti ép szövet, CRC: kolorektális karcinóma, CRC-NAT: karcinóma melletti ép szövet, FF: friss-fagyasztott, FFPE: formalinfixált, paraffinba ágyazott, IBD: gyulladósos bélbetegség, skDNS: sejten kívüli szabad DNS.

Mintatípus	Globális DNS-metiláció vizsgálata (n)				Metodikai vizsgálat (n)			
	Szövet			Vér	Szövet		Vér	
	FF	FFPE	<i>in silico</i> analízis	skDNS	FF	FFPE	skDNS	buffy coat
N	45	-	20	10	45	9	36	19
AD-NAT	23	20	-	-	23	-	-	-

<b>CRC-NAT</b>	25	20	-	-	24	-	-	-
<b>AD</b>	37	20	20	14	37	12	-	10
<b>CRC</b>	38	20	20	13	36	-	-	10
<b>IBD</b>	15	-	-	11	15	-	-	3

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

Összesen 183 friss-fagyasztott (FF), 40 formalinfixált, paraffinba ágyazott (FFPE) vastagbéliszöveti mintát, illetve 48 vérmintát gyűjtöttünk össze. A perifériás vérmintákat könyökvénából gyűjtöttük 6ml-es K3EDTA (Greiner Bio-One GmbH) vérvételi csövekbe.

##### 4.1.1.1. Vastagbéliszöveti minták

A globális DNS-metiláció analízisét LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással FF szöveti mintákon végeztük. Az endoszkópia során gyűjtött szövetbiopsziákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Az FF minták 45 egészséges (N), 23 adenóma melletti ép (AD-NAT), 23 karcinóma melletti ép (CRC-NAT), 37 adenóma (AD), 38 CRC és 15 IBD-s mintát foglaltak magukban. AD minták esetén vizsgáltunk tubuláris (TA, n=25) és tubulovillózus (TVA, n=9) altípusokat, míg a CRC csoportban Astler és Coller által módosított Dukes-féle rendszer szerint A és B (korai, n=13), valamint C és D (kései, n=23) alcsoportokat alkottunk. A párosított NAT biopsziák gyűjtése a tumortól 10-12 cm-es távolságból valósult meg.

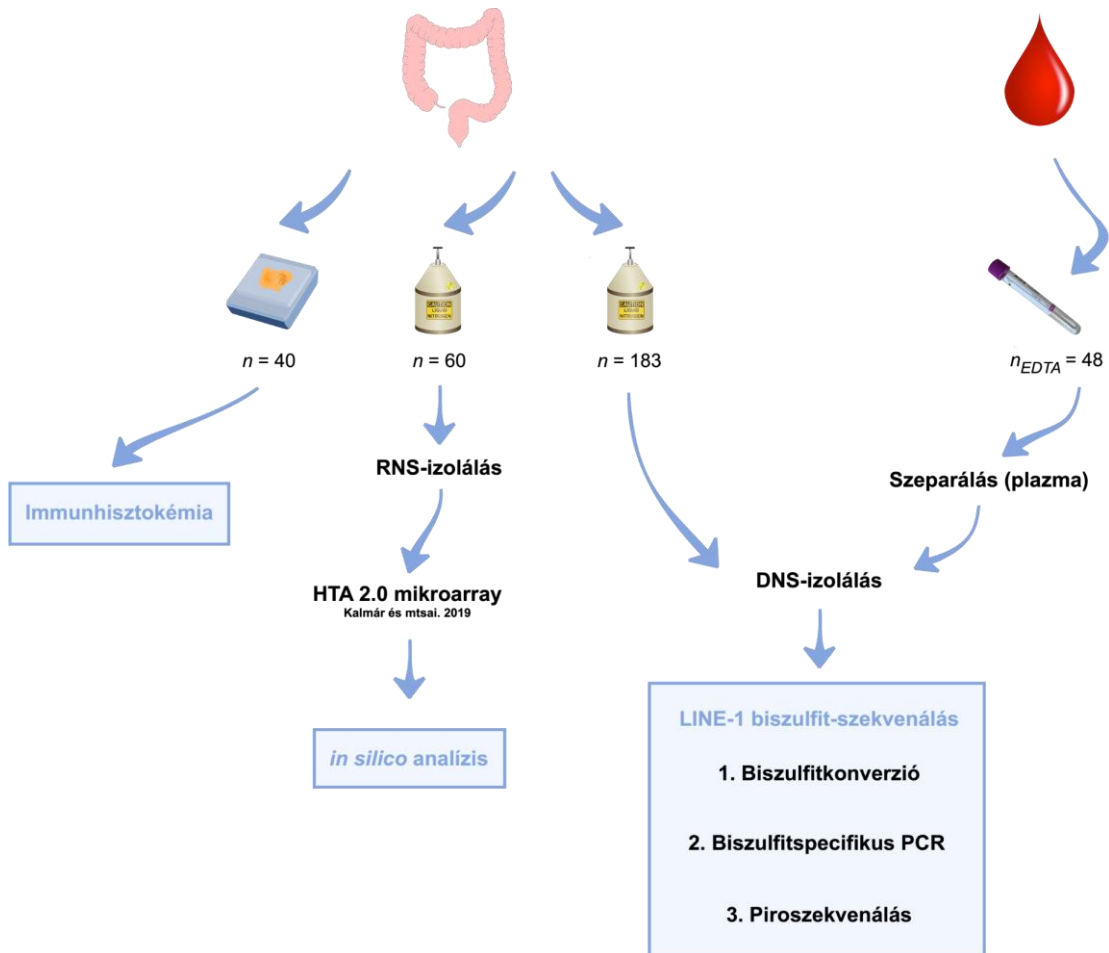
A globális DNS-metiláció és az *MTHFR* gén mutációs státusza közötti összefüggés analízisét FF N ( $n_{677CC}=11$ ,  $n_{677CT}=12$ ,  $n_{1298AA}=16$ ,  $n_{1298AC}=7$ ), AD ( $n_{677CC}=16$ ,  $n_{677CT}=12$ ,  $n_{1298AA}=17$ ,  $n_{1298AC}=10$ ) és CRC ( $n_{677CC}=20$ ,  $n_{677CT}=14$ ,  $n_{1298AA}=11$ ,  $n_{1298AC}=19$ ) mintákon végeztük.

A globális DNS-hipometiláció szöveti vizualizációját, illetve a folsav és a SAM mennyiség vizsgálatát olyan FFPE mintákon végeztük (20 AD és 20 CRC), amelyekben a tumor-NAT tranzíciós zóna is megfigyelhető volt.

#### 4.1.1.2. Folyadékbiopsziák

A globális DNS-metilációs szintet vérplazmában 10 egészséges, 14 AD-s, 13 CRC-s és 11 IBD-s betegől standard K3EDTA vérvételi csövekbe gyűjtött mintákon elemeztük LINE-1 biszulfít-piroszekvenálással.

A globális DNS-metiláció változásának analizésébe, valamint kialakulásának hátterében álló lehetséges okok elemzésébe bevont mintákat és az alkalmazott technikákat a 9. ábrán foglaltuk össze.



**9. ábra. A globális DNS-metiláció vizsgálatába bevont minták és az alkalmazott technikák összefoglalása.** A globális DNS-metiláció változását elemeztük vastagbél szövet- (n=183, N, AD-NAT, CRC-NAT, AD, CRC és IBD) és vérmintákon (n=48, N, AD, CRC és IBD). FF szövetbiopsziákból, valamint teljes vérből szeparált

plazmamintákból DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-minták biszulfitekverzióját követően biszulfitspecifikus PCR-t végeztünk, az ampikonokat piroszekvenáltunk. Munkacsoportunk által 60 vastagbéliszöveti biopsziából végzett HTA 2.0 microarray analízis bioinformatikai elemzését végeztünk (190). Célunk volt az mRNS-expressziós változások feltárása a kolorektális normál-adenóma-karcinóma szekvencia mentén a DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó gének esetében. A metildonor molekulák elérhetőségét immunhisztokémiai festésekkel elemeztük vastagbéliszöveti metszeteken (n=40).

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

A LINE-1 biszulfitekverzióval mért globális DNS-metilációs szintet befolyásoló metodikai faktorok vizsgálatához 180 FF és 25 FFPE vastagbéliszöveti biopsziát gyűjtöttünk, továbbá 63 K3EDTA és 12 skDNS-t tartósító vérvételi csövekbe (Cell-free DNA Collection tube, Roche) vért vettünk. Az skDNS tartósítására szolgáló vérvételi csövekre Roche vérvételi csövekként hivatkozunk a továbbiakban.

##### **4.1.2.1. Vastagbéliszöveti minták**

Az FF minták 45 N, 23 AD-NAT, 24 CRC-NAT, 37 AD, 36 CRC és 15 IBD-s esetet foglaltak magukban, amelyek esetén megfigyeltük a piroszekvenálás során analizált 3 CpG-hely metilációs szintjét egymástól elkülönítve, illetve átlagolva egyaránt.

A mintagyűjtés módjának vizsgálatához 24 CRC-NAT és 36 CRC endoszkóposan vett, valamint 21 CRC-NAT és 21 CRC műtétilag eltávolított biopsziát elemeztünk.

A minták fixálásának LINE-1 metilációra gyakorolt hatását FF-hez párosított FFPE minták vizsgálatával analizáltunk 9 N és 12 AD-s biopszia esetében.

A DNS-minták fagyasztva történő tárolásának LINE-1 metilációra kifejtett hatását párhuzamos mintákon elemeztük. A rövid távú tárolás (2 nap) esetén 27, míg a hosszú távú tárolás (2 év) során 48 minta LINE-1 metilációját hasonlítottuk az első mérések eredményeihez. Továbbá, kontrollvizsgálatként biszulfitekvertált, nem metilált (rövid távú tárolás n=7, hosszú távú tárolás n=10) és metilált (rövid távú tárolás n=7,

hosszú távú tárolás n=12) DNS-standardokat (EpiTect Control DNA és Control DNA Set, Qiagen) is bevontunk.

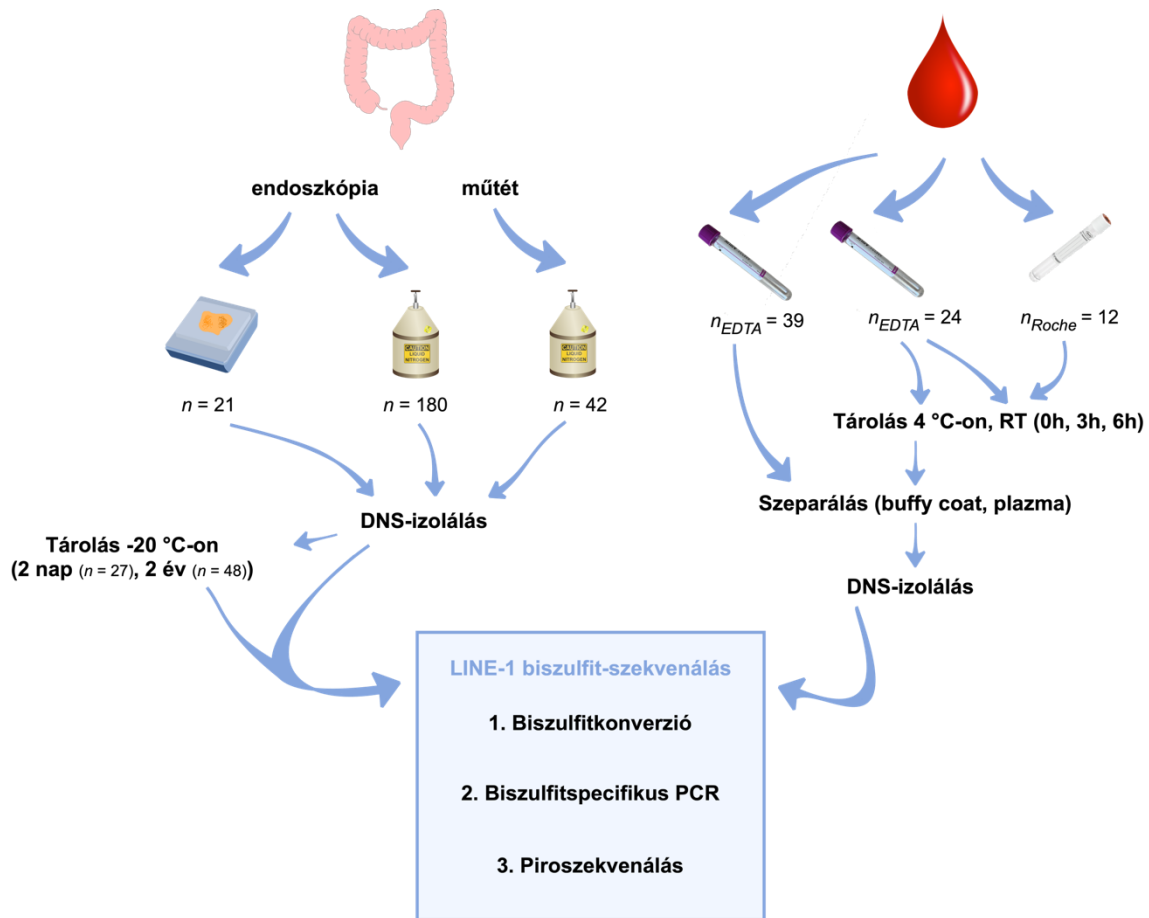
#### **4.1.2.2. Folyadékbiopsziák**

Vérmintákat gyűjtöttünk a piroszekvenáló kit által vizsgált 3 CpG-hely metilációs szintjének különálló és együttes analizisére, illetve a különböző vérvételi csövek, tárolási idő és hőmérséklet LINE-1 metilációt befolyásoló hatásának elemzésére.

A piroszekvenáló kit által vizsgált 3 CpG-hely metilációs szintjének analízise során - a fent említett szövetbiopsziák mellett - 19 N, 3 IBD-s, 10 AD-s, 10 CRC-s páciens-től gyűjtött vérmintákból szeparált buffy coat frakciót is elemeztünk kontrollcsoportként.

Az Roche vérvételi csövekben található tartósítószer LINE-1 metilációra gyakorolt hatását 4 egészséges személy vérmintáiban vizsgáltuk. Ennek megfelelően K3EDTA csövek mellett Roche csövekbe is gyűjtöttünk vérmintákat ugyanazon személyektől. Mindkét vérvételi cső esetén analizáltuk a plazma és buffy coat szeparálásáig eltelt idő hatását, míg K3EDTA csövek esetén a tárolási hőmérséklet LINE-1 piroszekvenálás eredményeire kifejtett hatását is megfigyeltük. Egy párosított K3EDTA és Roche csövekbe vett vérminta rögtön vérvétel után feldolgozásra került, míg további párhuzamosokat 3, illetve 6 óra elteltével szeparáltunk. A konvencionális K3EDTA csövekbe vett folyadékbiopsziák esetén szobahőmérsékleten (RT), valamint 4 °C-on tartott duplikátumokat is elemeztünk.

A különböző metodikai faktorok globális DNS-metilációra gyakorolt hatását vizsgáló analízisünkbe bevont mintákat és az alkalmazott technikákat a 10. ábrán foglaltuk össze.



**10. Ábra. A metodikai vizsgálatokba bevont minták és az alkalmazott technikák összefoglalása.** Az endoszkópos, illetve műtéti úton nyert N, AD, CRC, IBD, illetve párosított AD-NAT és CRC-NAT biopsziák fixálását (friss-fagyasztás vagy formalin) követően genomiális DNS izolálását végeztük. Az izolált DNS mintákat -20 °C-on tároltuk a további elemzések elvégzéséig. A tárolás hatásának vizsgálata során az első méréstől számított 2 nap (n=27), illetve 2 év (n=48) elteltével végeztük a második LINE-1 biszulfit-piroszekvenálást ugyanazon a DNS-mintákon. Vérmintákat gyűjtöttünk standard K3EDTA vérvételi csövekbe a piroszekvenáló kit által analizált 3 CpG-hely metilációjának egyedi, illetve átlagolt értékének vizsgálatára (n=39). Buffy coat réteg szeparálása, valamint genomiális DNS-izolálást követően a mintákat LINE-1 biszulfit-piroszekvenáltuk. További vérmintákat vizsgáltunk az alkalmazott vérvételi csövek (K3EDTA és Cell-free DNA Collection tubes, Roche), illetve a teljes vér tárolási körülményeinek LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának meghatározására (n=36). A buffy coat, illetve a plazma szeparálását követően genomiális és sejten kívüli szabad DNS-t izoláltunk, az izolált DNS-t végül szintén LINE-1 biszulfit-piroszekvenáltuk.



## 4.2. DNS-izolálás és kvantifikálás

A szöveti genomiális DNS izolálása FF és FFPE mintákból High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) használatával történt a gyártó utasításainak megfelelően. Az elúciót 100 µl RNáz- és DNáz-mentes desztillált vízzel végeztük.

A buffy coat réteg szeparálásához egylépéses, a plazma frakció elválasztásához pedig kétlépéses centrifugálást (1350 rcf, 12 perc) alkalmaztunk teljes vérmintákból. A genomiális DNS izolálását a buffy coat mintákból High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) használatával végeztük 200µl kiindulási mennyiségből. A Roche vérvételi gyűjtőcsövekbe levett vérmintákból szeparált buffy coat esetén egy és két órán keresztül történő proteináz K (ProtK) kezelést is alkalmaztunk párhuzamos mintákon. Az izolált DNS elúciójához 100 µl RNáz- és DNáz-mentes desztillált vizet használtunk.

A plazma frakcióból történő skDNS-izolálásra a Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kitet (Zymo Research) használtuk a gyártói leírásnak megfelelően. A globális DNS-metilációs mintázat plazmában való megjelenésének vizsgálata során 3,5 ml, míg a metodikai faktorok LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának analízisekor 2 ml plazmamennyiségből indultunk ki. Az elúció 50 µl RNáz- és DNáz-mentes desztillált vízben történt.

A DNS koncentrációjának és tisztaságának (OD260/280, OD230/280) meghatározására NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) eszközt alkalmaztunk a szöveti és buffy coat mintákból izolált DNS esetén, míg a plazma frakció skDNS koncentrációját Qubit 1.0 fluorométeren Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük.

Minden DNS-mintát -20 °C-on tároltunk a további analízisek elvégzéséig.

## 4.3. LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás

A DNS-mintákat EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research) használatával biszulfidkonvertáltuk a gyártói instrukcióknak megfelelően. A következő kiindulási DNS-mennyiségeket alkalmaztuk: 500 ng minden FF és FFPE szöveti biopsziából, 200 ng minden buffy coat mintából és hozzávetőlegesen 20 ng minden

plazmából izolált DNS esetén. A biszulfitkonverziót követően, a LINE-1 promóter 146 bázispár hosszúságú szakaszának biszulfitspecifikus amplifikálást végeztük (Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit, Qiagen, Németország) Mastercycler EP Gradient S PCR gépen (Eppendorf). A hőprogram a következő volt:

- Enzimaktivációs lépés: 90 °C, 15 perc
- 45 ciklus a következő lépésekből: denaturáció 94 °C, 30 másodperc; annealálás 50 °C, 30 másodperc; lánchosszabítás 72 °C, 30 másodperc;
- Végző extenziós lépés: 72 °C, 10 perc.

A PCR specificitását gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, 2%-os agarózgél alkalmazásával. Az amplikonok piroszekvenálást megelőző előkészítése és mosási lépései PyroMark Q24 Vacuum munkaállomáson (Qiagen) történtek. A piroszekvenálást Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit (Qiagen) és PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen) használatával hajtottuk végre Pyromark Q24 (Qiagen) műszer segítségével. A 146 bázispár hosszúságú szakaszban található három CpG-dinukleotid (318-as pozíció (CpG-pozíció 3 - CpG 3), 321-es pozíció (CpG-pozíció 2 - CpG 2) és 328-as pozíció (CpG-pozíció-1 - CpG 1), GenBank azonosító: X58075) metilációja az adott pozícióba beépült citozin- és timintartalmú nukleotidok arányából számítható a Pyromark Q24 v2.0.6 szoftver segítségével. A teljes protokoll gyártói utasításoknak megfelelően került elvégzésre.

#### **4.4. *In silico* génexpresszió analízis**

A DNS-metiláció folyamatához köthető enzimrendszereket kódoló gének expresszióját *in silico* vizsgáltuk a Kalmár és mtsai. által készített Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix) eredményei alapján (190). Ez az elemzés 20 N, 20 AD és 20 CRC minta mRNS-expressziójának feltérképezését foglalta magában. Az adatok a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbázisba feltöltve, a GSE100179 referenciaszámon érhetőek el. Munkánk során az *in silico* analízist Transcriptome Analysis Console 4.0 szoftver (TAC 4.0, Affymetrix) alkalmazásával végeztük, a következő kritériumok mentén: korrigált  $p$ -érték  $\leq 0,05$ ; expressziós intenzitáskülönbség (fold change, FC)  $\geq |1,4|$ .

#### 4.5. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai festéseinket 5 µm vastagságú AD (n=20) és CRC (n=20) FFPE metszeteken végeztük. A deparaffinálást követően az antigénfeltárást fémkuktában hajtottuk végre. Az endogén peroxidázok inaktiválásának céljából a metszeteket 3%-os hidrogénperoxid oldatban inkubáltuk 30 percig, míg az aspecifikus jelek blokkolását 1%-os BSA-oldat segítségével végeztük el szobahőmérsékleten, szintén 30 percen keresztül. A metszeteket a következő elsődleges antitestekkel festettük gyártói leírásnak megfelelően: anti-DNMT1 (AB19905, Abcam, 1:100), anti-DNMT3a (ab16704, Abcam, 1:300), anti-DNMT3b (ab122932, Abnova, 1:100) és anti-FOLR2 (ab228643, Abcam, 1:500). Folsav, SAM és 5mC esetén a metszeteket a 3%-os hidrogén-peroxid inkubációt követően először 0,1% Tween-TBS oldattal kezeltük 10 percen keresztül. Az antigének feltárása 2N HCl oldat használatával történt (15 perc, RT). A pH normalizálását 8,3-as pH-val rendelkező 100mM TBS-sel végeztük. Az aspecifikus kötődés megakadályozására szintén 1%-os BSA-oldat inkubációt alkalmaztunk 30 percen keresztül. Az elsődleges antitesteket (anti-folsav (PAB0092, Abnova, 1:500), anti-S-adenozil-metionin (Clone 118-18, 6942-25, BioVision, 1:200), anti-5-metilcitozin (ab214727, Abcam, 1:500)) protokollnak megfelelően használtuk. A mosási lépéseket követően a metszetek egy órán keresztül inkubáltuk a másodlagos antitestekkel (anti-nyúl antitest (BA1054, Boster), anti-patkány antitest (18-4818-82, Invitrogen) és anti-egér antitest (62-6520, Invitrogen)) a gyártói útmutatóban foglalt hígítások szerint, szobahőmérsékleten.

A jelölés előhívását DAB kromogén (K3468, DAKO) és HISTOLS-DAB szubsztrát (30014. K, Histopathology Ltd.) használatával végeztük, továbbá a sejtmagokat hematoxilinnal festettük. A festéseket Panoramic Confocal műszerrel digitalizáltuk és Panoramic Viewer (v: 1.15.3, 3DHISTECH) szoftver használatával értékeltük ki. A jelölődés intenzitását 0 és +3 értékek között osztályoztuk, ahol 0 negatív, +1 gyenge, +2 közepes és +3 erős immunhisztokémiai festődést jelentett, majd módosított Quick-score (Q-score) technika segítségével kiértékeljük a következő egyenlet alapján:  $Q\text{-score} = I \times P$ , I: a pozitív sejtek festődési intenzitása, P: pozitív sejtek százalékos aránya, maximum értéke:  $300 = (3 \times 100)$  (191). Az epitéliális és strómális régiókat minden minta esetében külön-külön értékeltük.

## **4.6. Statisztikai vizsgálatok**

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

A statisztikai szignifikancia ( $p \leq 0,05$ ) megállapítását és a ROC (receiver operating characteristic, vevő működési karakterisztika) analízist Prism8 szoftver (GraphPad) használatával végeztük. Többszörös összehasonlítás és nem normális eloszlás esetén Kruskal-Wallis és Dunn többszörös összehasonlítás teszteket használtunk, míg normális eloszlást mutató adatainkon ANOVA, majd Brown Forsythe, valamint Welch-féle ANOVA próbákat alkalmaztunk. Páros összehasonlítások során párosított t-tesztet vagy Wilcoxon tesztet végeztünk annak függvényében, hogy parametrikus vagy nem parametrikus eloszlást tapasztaltunk.

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

Statisztikai szignifikanciák számolását ( $p \leq 0,05$ ) szintén Prism8 szoftverrel (GraphPad) végeztük. Többszörös összehasonlítás során nem parametrikus eloszlást mutató adatainkon Kruskal-Wallis és Dunn többszörös összehasonlítás próbákat használtunk, míg normális eloszlás esetén ANOVA, majd Brown Forsythe és Welch-féle ANOVA teszteket használtunk. Független mintacsoportok páros összehasonlítására normális eloszlás esetén párosítatlan t-próbát, nem normális eloszlást mutató adatok esetén Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Az életkor és LINE-1 metiláció közötti korreláció vizsgálatát Spearman teszttel végeztük.

## 5. Eredmények

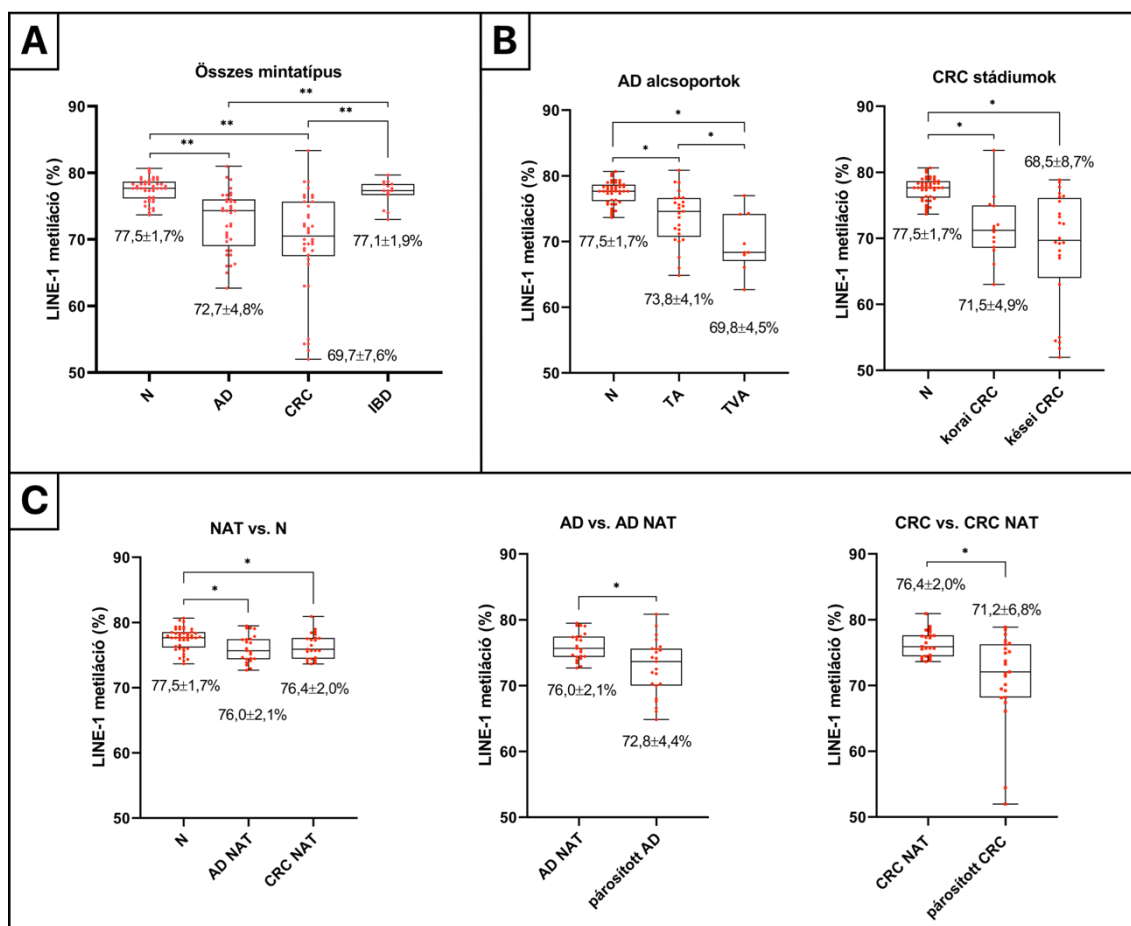
### 5.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának hátterében álló lehetséges okok feltérképezése

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

Vastagbél-szövetminták globális DNS-metilációjának tanulmányozása során átfogó analízist végeztünk LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás alkalmazásával kolorektális N, AD-NAT, CRC-NAT, AD, CRC és IBD biopsziákon. A Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit által vizsgált CpG-pozíciók metilációjának átlagolt értékeit elemeztük.

Szignifikáns LINE-1 metiláció csökkenést tapasztaltunk AD ( $72,7\pm 4,8\%$ ) és CRC ( $69,7\pm 7,6\%$ ) szövetmintákban az N ( $77,5\pm 1,7\%$ ) és IBD ( $77,1\pm 1,9\%$ ) biopsziákhoz képest ( $p\leq 0,01$ ), míg IBD esetén nem figyeltünk meg szignifikáns metiláció változást az N mintákhoz viszonyítva (11. Ábra/A). Szintén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt detektáltunk a TA ( $73,8\pm 4,1\%$ ) és TVA ( $69,8\pm 4,5\%$ ) mintákban az egészséges biopsziákhoz ( $77,5\pm 1,7\%$ ) hasonlítva ( $p\leq 0,05$ ), valamint a TVA mintákban ( $69,8\pm 4,5\%$ ) a TA ( $73,8\pm 4,1\%$ ) alcsoportozáshoz képest ( $p\leq 0,05$ ). Korai ( $71,5\pm 4,9\%$ ) és kései ( $68,5\pm 8,7\%$ ) stádiumú CRC-s betegektől gyűjtött mintákhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb metilációt mértünk az ép biopsziákban ( $77,5\pm 1,7\%$ ,  $p\leq 0,05$ ), valamint a CRC stádiumok összevetése során csökkent LINE-1 metilációt tapasztaltunk a rák progressziója mentén (11. Ábra/B). Az AD-NAT ( $76,0\pm 2,1\%$ ) és CRC-NAT ( $76,4\pm 2,0\%$ ) biopsziák szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet mutattak az N mintákhoz hasonlítva ( $77,5\pm 1,7\%$ ) ( $p\leq 0,05$ ). Továbbá az AD ( $72,8\pm 4,4\%$ ) és a CRC ( $71,2\pm 6,8\%$ ) minták szignifikánsan csökkent metilációs értékekkel rendelkeztek a párosított AD-NAT ( $76,0\pm 2,1\%$ ) és CRC-NAT ( $76,4\pm 2,0\%$ ) csoportokhoz képest ( $p\leq 0,05$ ) (11. Ábra/C).

Az elemzett mintacsoportok CpG-pozícióinak szeparált metilációs értékeit a függelék F1/A., F2/A., F3/A. és F4/A. táblázatában foglaltuk össze.



**11. Ábra.** A globális DNS-metiláció vizsgálata vastagbéliszöveti mintákban LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással. A) Szignifikánsan alacsonyabb globális DNS-metilációt figyeltünk meg AD (n=37) és CRC (n=38) mintákban az N (n=45) és IBD (n=15) biopsziákhoz képest ( $p \leq 0,01$ ). IBD vs. N összehasonlításban nem tapasztaltunk eltérést. B) TVA (n=9) és TA (n=25) biopsziák esetén szignifikánsan kisebb metilációs szintet mértünk az ép mintákhoz hasonlítva, illetve a TVA csoportban is TA adenómákhoz képest ( $p \leq 0,05$ ). Korai (n=13) és kései CRC-s (n=23) minták összevetése esetén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1-metilációs szintet detektáltunk az egészséges biopsziákhoz viszonyítva, illetve csökkenő trendet tapasztaltunk a kései vs. korai stádiumú CRC-s csoportok összevetése esetén. C) Az AD-NAT (n=23) és CRC-NAT (n=25) biopsziákban szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt találtunk az ép biopsziákhoz hasonlítva (bal oldal,  $p \leq 0,05$ ), azonban a párosított tumor mintákkal összevetve szignifikánsan nagyobb metilációs értékkel rendelkeztek (közép és jobb oldal,  $p \leq 0,05$ ). AD: kolorektális adenóma, AD-NAT: adenóma melletti ép szövet, CRC:

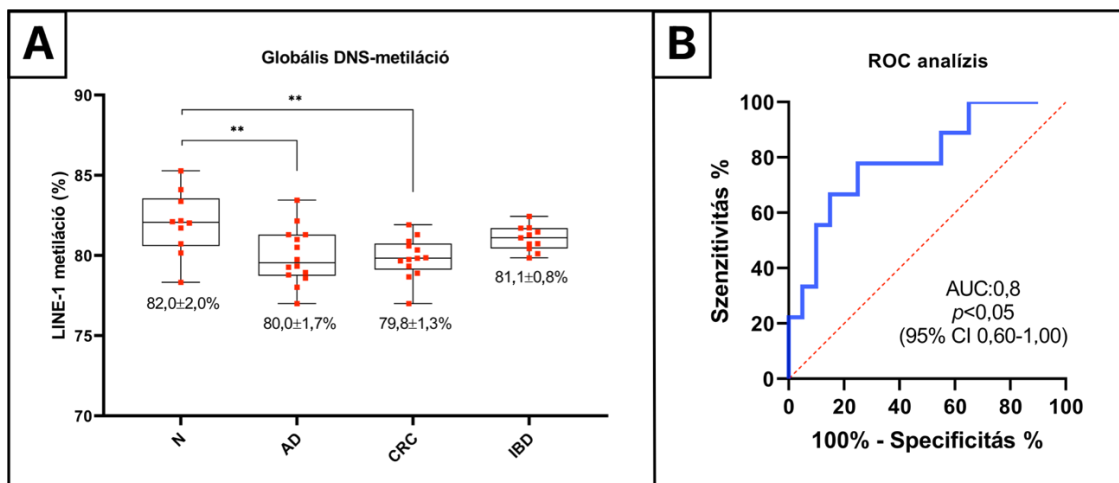
kolorektális karcinóma, CRC-NAT: karcinóma melletti ép szövet, IBD: gyulladós bélbetegség, N: egészséges, TA: tubuláris adenóma, TVA: tubulovillózus adenóma.

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

A vastagbéliszöveti globális DNS-hipometiláció megfigyelését követően egészséges, AD-s, CRC-s és IBD-s páciensektől gyűjtött plazmaminták skDNS frakciójának genomszintű metilációs mintázatát határoztuk meg. A szöveti minták elemzéséhez hasonlóan analízisünk során a Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit által vizsgált CpG-pozíciók metilációjának átlagolt értékeit elemeztük.

Szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációs szintet tapasztaltunk AD ( $80,0 \pm 1,7\%$ ) és CRC ( $79,8 \pm 1,3\%$ ) plazmákból izolált skDNS mintákban az N mintákhoz ( $82,0 \pm 2,0\%$ ) képest ( $p \leq 0,01$ ), míg IBD ( $81,1 \pm 0,8\%$ ) betegektől gyűjtött plazmák esetén nem figyeltünk meg jelentős eltérést a többi csoporthoz viszonyítva (12. Ábra/A). A LINE-1 metiláció diagnosztikus hatékonyságát ROC analízissel vizsgáltuk az AD minták egészségesektől történő megkülönböztetésére vonatkozóan. A LINE-1 metiláció 66,7%-os szenzitivitás és 90,0%-os specificitás értékekkel volt képes elkülöníteni az adenómás mintákat a normáloktól 80,0% LINE-1 metilációs határérték esetén (AUC (area under curve, görbe alatti terület): 0,8;  $p < 0,05$ ; 95% CI (confidence interval, konfidenciaintervallum) 0,6-1,0) (12. Ábra/B).

Az elemzett mintacsoportok CpG-pozícióinak szeparált metilációs értékeit a függelék F1/C., F2/C., F3/D. és F4/C. táblázatában foglaltuk össze.



**12. Ábra. A globális DNS-metiláció vizsgálata LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással plazmamintákban.** A) Szignifikánsan alacsonyabb LINE-1-metilációt figyeltünk meg AD (n=14), illetve CRC (n=13) páciensektől gyűjtött plazmamintákban az egészséges személyekhez (n=10) képest (\*\* $p \leq 0,01$ ). Az IBD (n=11) vs. N összehasonlítás során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. B) ROC (receiver operating characteristic, vevő működési karakterisztika) analízis alapján, a LINE-1-metiláció 66,7%-os szenzitivitás és 90,0%-os specificitás értékekkel különítette el az AD betegektől származó plazmamintákat az egészségesektől, 80,0% LINE-1 metilációs határérték mellett (AUC: 0,8;  $p < 0,05$ ; 95% CI 0,6-1,0). AD: kolorektális adenóma, AUC: görbe alatti terület (area under curve), CI: konfidenciaintervallum (confidence interval), CRC: kolorektális karcinóma, IBD: gyulladós bélbetegség, ROC: vevő működési karakterisztika (receiver operating characteristic).

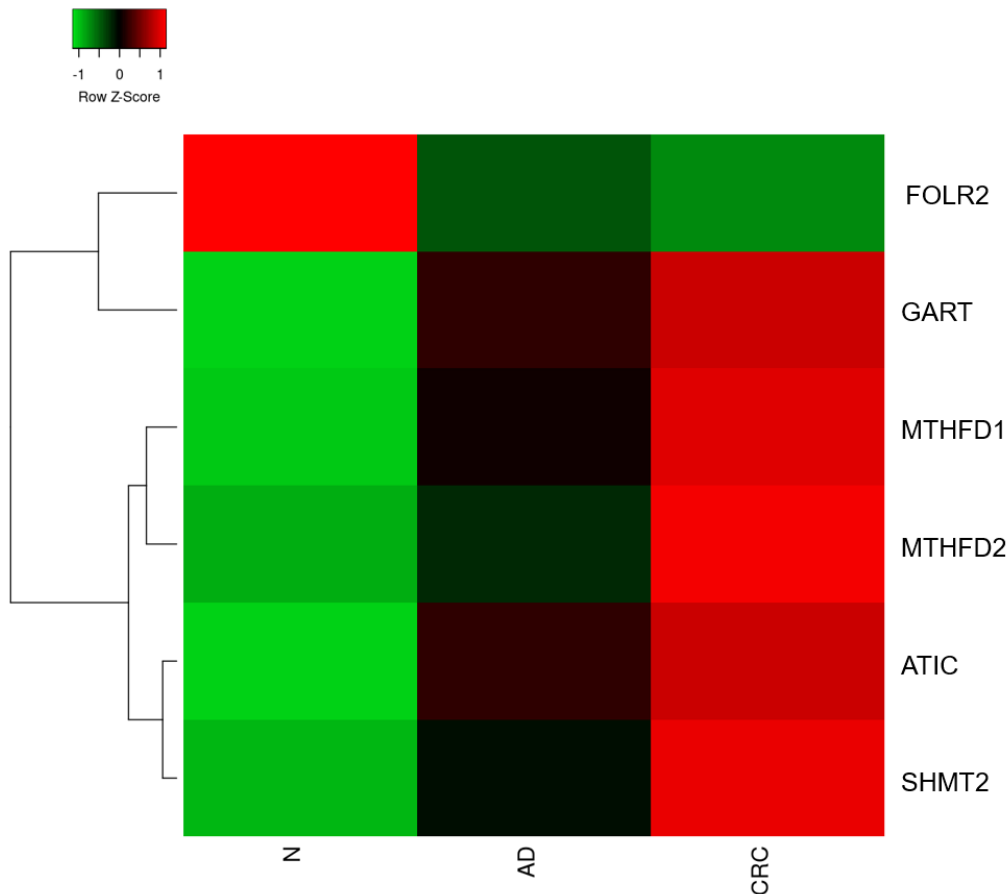
### 5.1.3. A DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó enzimek *in silico* génexpressziós vizsgálata

Munkacsoportunk által elvégzett teljes transzkriptom-analízis (GeneChip™ HTA 2.0) eredményeit (190) *in silico* elemeztük a metilációs és demetilációs folyamatokhoz kapcsolódó enzimek, az 1C ciklus enzimrendszerének tagjai, illetve a folátreceptorok esetén.

A 12. ábra kizárólag olyan géneket tartalmaz, amelyek expressziós változása mind AD vs. N, mind CRC vs. N összehasonlításban megfelelt a vizsgálati kritériumainknak (korrigált  $p \leq 0,05$ ;  $FC \geq |1,4$ ).



A *GART*, *MTHFD1*, *MTHFD2*, *ATIC* és *SHMT2* gének szignifikánsan magasabb mRNS-expressziót mutattak AD és CRC mintákban az egészségesekhez képest, míg a folátreceptor  $\beta$  (FR $\beta$ ) fehérjét kódoló *FOLR2* gén kifejeződése szignifikánsan csökkent a tumoros mintákban ( $p \leq 0,05$ ) (13. Ábra).



**13. Ábra. A DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó enzimek mRNS-expressziós szintjének változása a vastagbél tumorok kialakulása során.** Az ábrán kizárólag azokat a géneket tüntettük fel, amelyek mRNS-expressziója megfelelt az analízis kritériumainak (AD vs. N, CRC vs. N: korrigált  $p \leq 0,05$ ;  $FC \geq |1,4|$ ). A hőtérkép zöld színe csökkent, piros színe növekedett transzkriptumszintet jelöl. Minden sor különböző gént, míg minden oszlop eltérő mintacsoportot ábrázol (N: egészséges,  $n=20$ ; AD: kolorektális adenóma,  $n=20$ ; CRC: kolorektális karcinóma,  $n=20$ ). Az öt, tumoros mintákban szignifikánsan emelkedett expressziót mutató gén (*GART*, *MTHFD1*, *MTHFD2*, *ATIC* és *SHMT2*) az 1C metabolizmus enzimszisztémájának tagja. Az FR $\beta$  fehérjét kódoló *FOLR2*

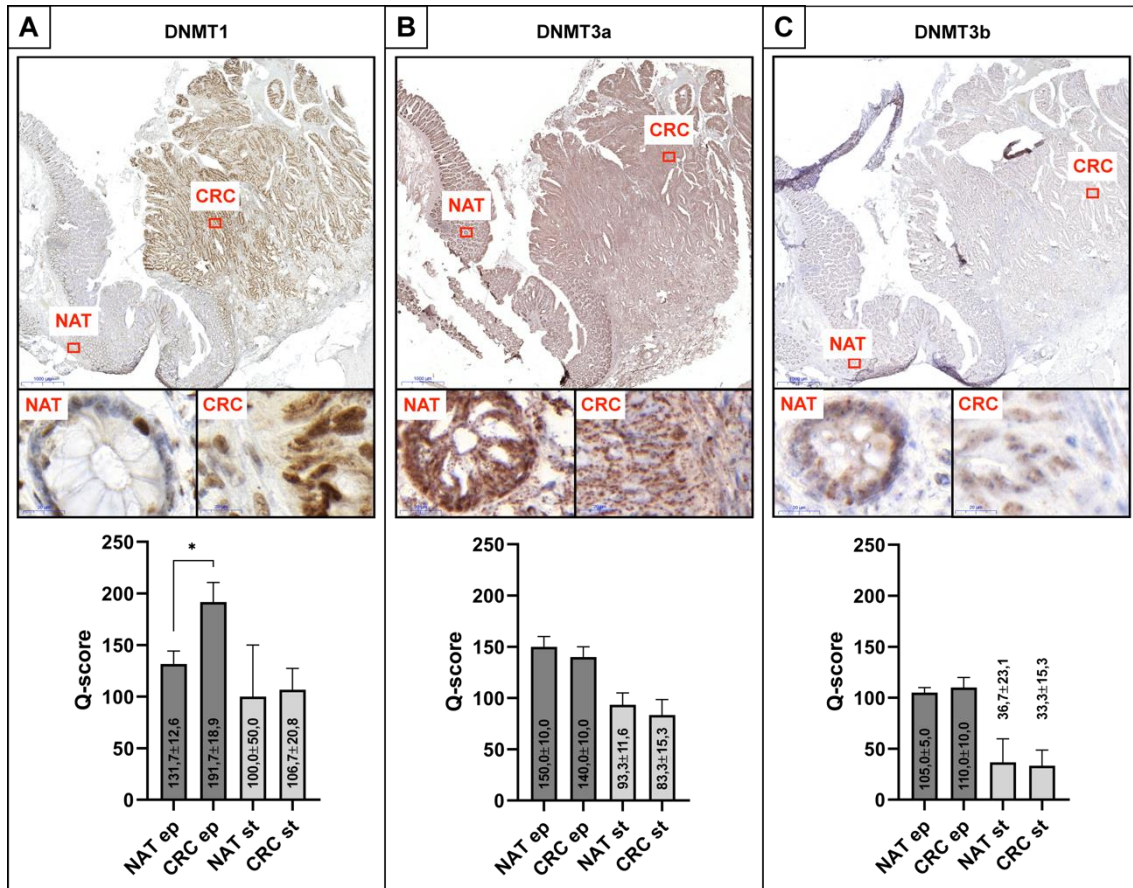
gén szignifikánsan alacsonyabb génkifejeződéssel rendelkezett AD és CRC mintákban az N mintákhoz képest. N: egészséges, AD: kolorektális adenóma, CRC: kolorektális karcinóma.

A 13. ábrán nem ábrázolt gének közül kiemelendő a *DNMT1*, az *APOBEC1*, valamint az *APOBEC3B*, amelyek csak az AD, vagy csak a CRC csoportokban mutattak szignifikáns expresszióváltozást az ép mintákhoz képest (Függelék, F1. Ábra). A *DNMT1* szignifikánsan emelkedett génkifejeződést mutatott a CRC mintákban az N mintákhoz viszonyítva (FC=1,5;  $p \leq 0,05$ ), továbbá az *APOBEC1* (FC=1,9) szignifikánsan felülexpresszáldott, illetve az *APOBEC3B* (FC=-1,5) szignifikánsan csökkenő átíródást mutatott az AD biopsziákban az ép mintákhoz hasonlítva ( $p \leq 0,05$ ).

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

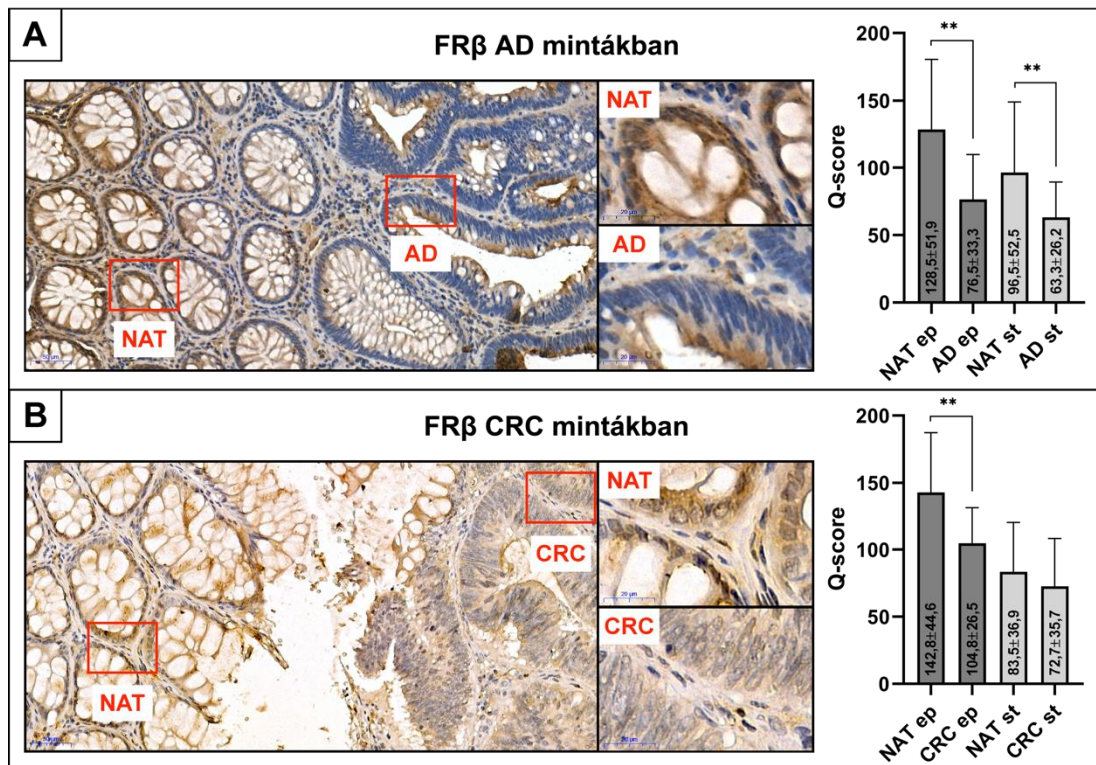
A *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* és *FOLR2* gének expressziós eredményeit immunhisztokémiai festésekkel validáltuk tranzíciós zónát tartalmazó vastagbéliszöveti metszeteken. A kiértékelést Quick-score technika segítségével végeztük.

A DNMT1 enzimek nukleáris jelölődése hámsejtekben szignifikánsan nagyobb intenzitást mutatott a rákos területeken ( $191,7 \pm 18,9$ ) az ép régiókhöz ( $131,7 \pm 12,6$ ) viszonyítva ( $p \leq 0,05$ ), míg nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a strómasejtek festése során (NAT st:  $100,0 \pm 50,0$ ; CRC st:  $106,7 \pm 20,8$ ). A DNMT3A és 3B fehérjék elemzésekor nem figyeltünk meg szignifikáns változást a sejtmagok festődésének mértékében tumoros, illetve ép területek összehasonlításakor, sem a hám-, sem a strómasejtek esetén (DNMT3A NAT ep:  $150,0 \pm 10,0$ ; CRC ep:  $140,0 \pm 10,0$ ; NAT st:  $93,3 \pm 11,6$ ; CRC st:  $83,3 \pm 15,3$ ; DNMT3B NAT ep:  $105,0 \pm 5,0$ ; CRC ep:  $110,0 \pm 10,0$ ; NAT st:  $36,7 \pm 23,1$ ; CRC st:  $33,3 \pm 15,3$ ) (14. Ábra).



**14. Ábra. A DNMT enzimek immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei.** Az ábrán a DNMT1 (A), a DNMT3A (B) és a DNMT3B (C) fehérjék expressziójának változása látható NAT és CRC régiókban. A DNMT1 szignifikáns felülexpressziót mutatott a CRC-s területek hámsejtjeiben az ép zóna epiteliális sejtjeihez képest ( $*p \leq 0,05$ ), míg a strómasejtek esetén csak mérsékelt változást tapasztaltunk. A DNMT3A és 3B enzimek expressziójának tanulmányozása során nem detektáltunk jelentős változást a vizsgált régiók között egyik sejtípus esetén sem. CRC: kolorektális karcinóma, NAT: karcinóma melletti ép szövet, ep: epitelsejtek, st: strómasejtek.

A *FOLR2* gén által kódolt FR $\beta$  citoplazmatikus jelölődése a receptorfehérje kifejeződésében szignifikáns csökkenést mutatott az AD-s minták epiteliális ( $76,5 \pm 33,3$ ) és strómális sejtjeiben ( $63,3 \pm 26,2$ ) is, valamint a CRC-s régiók hámsejtjeiben ( $104,8 \pm 26,5$ ) a párosított NAT területekhez (AD-NAT ep:  $128,5 \pm 51,9$ ; AD-NAT st:  $96,5 \pm 52,5$ ; CRC-NAT ep:  $142,8 \pm 44,6$ ) képest ( $p \leq 0,01$ ). A rákos területek strómasejtjeiben enyhe intenzitáscsökkenést tapasztaltunk ( $72,7 \pm 35,7$ ) a NAT zónához viszonyítva ( $83,5 \pm 36,9$ ) (15. Ábra).



**15. Ábra. Az FRβ fehérje expressziójának vizsgálata immunhisztokémiával.** Az FRβ kifejeződése szignifikánsan csökkent az AD hám- és strómasejtekben (A), illetve a CRC epitelsejtekben (B) az ép területekhez képest (\*\* $p \leq 0,01$ ). A CRC régió strómasejtjeiben tapasztalt alacsonyabb mértékű festődés nem mutatott statisztikai szignifikanciát a NAT zónákhoz viszonyítva (B). AD: kolorektális adenóma, CRC: kolorektális karcinóma, ep: epitelsejtek, NAT: tumor melletti ép szövet, st: strómasejtek.

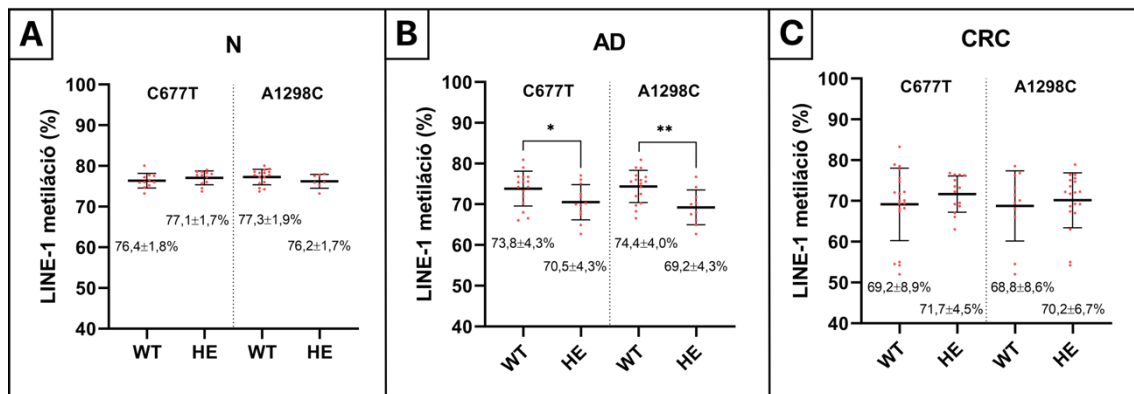
Mind a DNMT1, 3A és 3B, valamint mind a *FOLR2* által kódolt FRβ festődése tükrözte a microarray analízisünk eredményeit.

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

A globális DNS-hipometiláció kialakulásában szerepet játszó okok analízise során megvizsgáltuk a metiláció és az *MTHFR* gén mutációs státusza közötti összefüggést. Az elemzés során a gén két leggyakoribb mutációjának (C677T, A1298C) heterozigóta formáival (HE) jellemezhető vastagbéliszöveti minták LINE-1 metilációs

szintjét határoztuk meg kolorektális egészséges, adenómás, illetve karcinómás biopsziákban.

Ép minták esetén nem találtunk szignifikáns LINE-1 metilációs eltérést a HE (677CT: 77,1±1,7%, 1298AC: 76,2±1,7%) vs. vad típus (WT) (677CC: 76,4±1,8%, 1298AA: 77,3±1,9%) összehasonlításban (16. Ábra/A). Ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabb metilációt figyeltünk meg mindkét vizsgált mutáció esetén AD HE mintákban (677CT: 70,5±4,3%, 1298AC: 69,2±4,3%) a WT biopsziákhoz (677CC: 73,8±4,3%,  $p \leq 0,05$ ; 1298AA: 74,4±4,0%,  $p \leq 0,01$ ) hasonlítva (16. Ábra/B). CRC-s biopsziákban érdekes módon enyhe, nem szignifikáns metiláció-növekedést detektáltunk HE mintákban (677CT: 71,7±4,5%, 1298AC: 70,2±6,7%) a WT biopsziákhoz (677CC: 69,2±8,9%, 1298AA: 68,8±8,6%) képest mindkét mutáció esetén (16. Ábra/C).

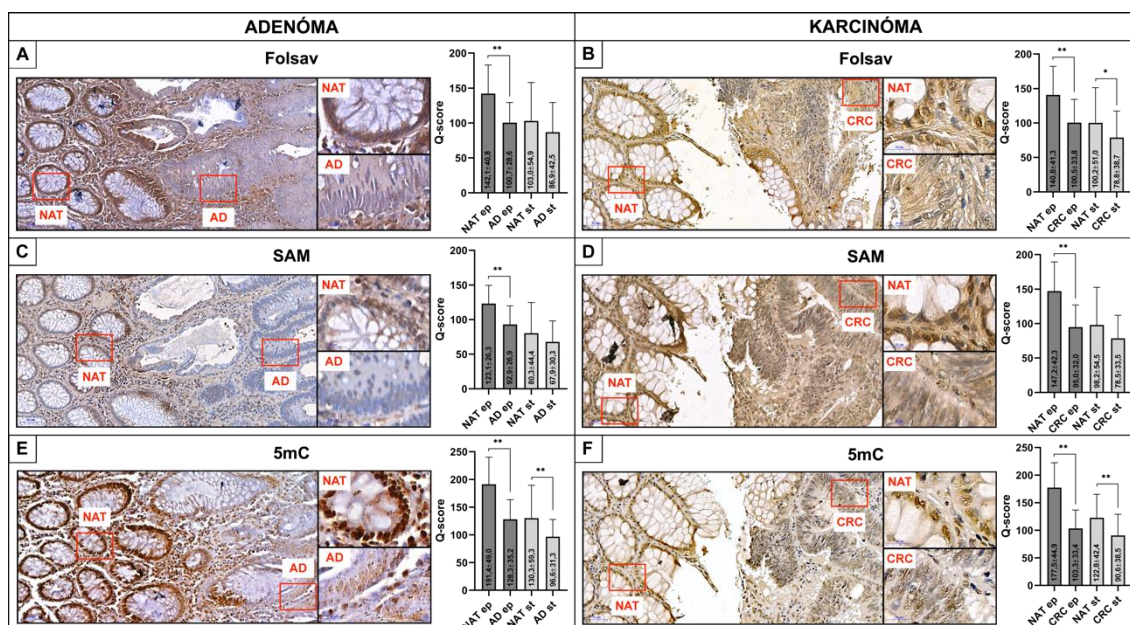


**16. Ábra.** A globális DNS-hipometiláció és az *MTHFR* gén gyakori mutációi (C677T, A1298C) közötti összefüggés vizsgálata LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással. A) Egészséges minták esetén nem tapasztaltunk eltérést az analizált csoportokban (C677T  $n_{WT}=11$ ,  $n_{HE}=12$ , A1298C  $n_{WT}=16$ ,  $n_{HE}=7$ ). B) AD mintákban szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációs értékeket találtunk 677CT és 1298AC genotípus esetén a vad típusokhoz ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ) képest (C677T  $n_{WT}=16$ ,  $n_{HE}=12$ , A1298C  $n_{WT}=17$ ,  $n_{HE}=10$ ). C) Vastagbélrákos biopsziákban mérsékelten magasabb LINE-1 metilációt figyeltünk meg mindkét mutáció esetén a HE vs. WT összehasonlítás során (C677T  $n_{WT}=20$ ,  $n_{HE}=14$ , A1298C  $n_{WT}=11$ ,  $n_{HE}=19$ ). AD: kolorektális adenóma, CRC: kolorektális karcinóma, HE: heterozigóta, WT: vad típus.

### 5.1.6. A metildonor molekulák mennyiségének vizsgálata vastagbéliszövetben immunhisztokémiával

A metildonor- (folsav, SAM) tartalom és az 5mC-festődés közötti összefüggés *in situ* tanulmányozására immunhisztokémiai festést alkalmaztunk. A kiértékelést Quick-score technika segítségével végeztük.

A folsav- (AD ep:  $100,7 \pm 28,6$ ; CRC ep:  $100,5 \pm 33,8$ ) (17. Ábra/A, B), SAM- (AD ep:  $92,9 \pm 26,9$ ; CRC ep:  $95,0 \pm 32,0$ ) (17. Ábra/C, D), valamint 5mC-festődés (AD ep:  $128,3 \pm 35,2$ ; CRC ep:  $103,3 \pm 33,4$ ) (17. Ábra/E, F) intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt mind az AD, mind a CRC minták hámsejtjeiben a párosított NAT területekhez képest (folsav AD-NAT ep:  $142,1 \pm 40,8$ ; CRC-NAT ep:  $140,8 \pm 41,3$ ; SAM AD-NAT ep:  $123,1 \pm 26,3$ ; CRC-NAT ep:  $147,2 \pm 42,3$ ; 5mC AD-NAT ep:  $191,4 \pm 49,0$ ; CRC-NAT ep:  $177,5 \pm 44,9$ ) ( $p \leq 0,01$ ). A strómasejtjeiben is enyhe intenzitáscsökkenést tapasztaltunk, amely szignifikáns volt az 5mC jelölés során AD (AD-NAT st:  $130,3 \pm 59,3$ ; AD st:  $96,6 \pm 31,3$ ) (17. Ábra/E) ( $p \leq 0,01$ ) és CRC (CRC-NAT st:  $122,8 \pm 42,4$ ; CRC st:  $90,6 \pm 38,5$ ) (17. Ábra/F) ( $p \leq 0,01$ ) mintákban, valamint folsav jelölés esetén a CRC biopsziákban (CRC-NAT st:  $100,2 \pm 51,0$ ; CRC st:  $78,8 \pm 38,7$ ) (17. Ábra/B) ( $p \leq 0,05$ ).



17. Ábra. A folsav és a SAM metildonor molekulák mennyiségének, valamint a globális DNS-metiláció mértékének immunhisztokémiai vizsgálata vastagbéliszövet-

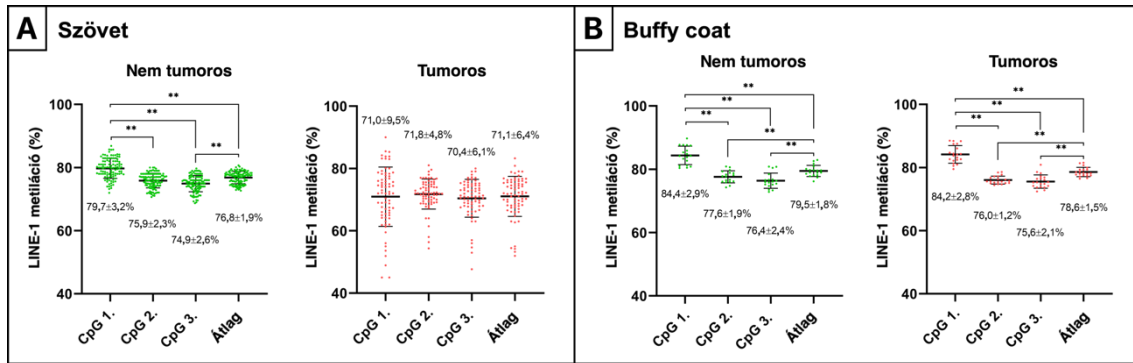
**mintákban immunhisztokémiával.** Szignifikánsan csökkenő folsav (A, B), SAM (C, D) és 5mC (E, F) intenzitást figyeltünk meg AD-s és CRC-s biopsziák epitelsejtjeiben. Enyhén alacsonyabb mértékű festődést tapasztaltunk a strómasejtek vizsgálata során, ami az AD (E) és CRC (F) strómasejtjeinek 5mC (\*\* $p \leq 0,01$ ), illetve a CRC-s biopsziák (B) strómasejtjeinek folsav jelölése esetén szignifikánsnak mutatkozott (\* $p \leq 0,05$ ). AD: kolorektális adenóma, CRC: kolorektális karcinóma, ep: epitelsejtek, NAT: tumor melletti ép szövet, st: strómasejtek.

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

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

Ezen vizsgálatunk során azt tanulmányoztuk, hogy a Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit által analizált három CpG-pozíció metilációjának különálló elemzése hordoz-e magában új információt az átlagolt metilációs értékek változásához képest.

Szignifikánsan magasabb metilációs szintet tapasztaltunk a CpG 1-es pozíció (79,7 $\pm$ 3,2%) esetén a CpG 2 (75,9 $\pm$ 2,3%), a CpG 3 (74,9 $\pm$ 2,6%), illetve a három CpG-dinukleotid átlagmetilációs értékéhez (76,8 $\pm$ 1,9%) képest a nem tumoros vastagbéliszöveti mintákban (N, AD-NAT, CRC-NAT és IBD) ( $p \leq 0,01$ ) (18. Ábra/A, bal oldal). Azonban érdekes módon a tumoros minták (AD, CRC) CpG-pozíciói (CpG 1: 71,0 $\pm$ 9,5%, CpG 2: 71,8 $\pm$ 4,8%, CpG 3: 70,4 $\pm$ 6,1%, átlag CpG: 71,1 $\pm$ 6,4%) között nem detektáltunk szignifikáns különbséget (18. Ábra/A, jobb oldal). Az analizált buffy coat frakciók esetén mind a nem tumoros, mind az adenómás és vastagbélrákos betegektől gyűjtött mintákban szignifikánsan nagyobb metilációs értékeket figyeltünk meg a CpG 1-es (nem tumoros: 84,4 $\pm$ 2,9%, tumoros: 84,2 $\pm$ 2,8%) pozícióban a CpG 2 (nem tumoros: 77,6 $\pm$ 1,9%, tumoros: 76,0 $\pm$ 1,2%), a CpG 3 (nem tumoros: 76,4 $\pm$ 2,4%, tumoros: 75,6 $\pm$ 2,1%), valamint az átlagolt metilációs értékekhez (nem tumoros: 79,5 $\pm$ 1,8%, tumoros: 78,6 $\pm$ 1,5%) viszonyítva (18. Ábra/B).



**18. Ábra. A Pyromark Q24 CpG LINE-1 esszé által vizsgált három CpG-pozíció szeparált, illetve együttes metilációs értékének összehasonlítása. A) CpG 1 esetén szignifikánsan magasabb metilációs százalékot tapasztaltunk a CpG 2, a CpG 3, illetve az átlagolt metilációs értékekhez hasonlítva nem tumoros kolorektális szöveti mintákban (N, AD-NAT, CRC-NAT és IBD, n=108) (bal oldal) (\*\* $p \leq 0,01$ ), míg AD és CRC (n=75) esetén nem találtunk különbséget (jobb oldal). B) Buffy coat frakciók analizálása során a nem tumoros (egészséges és IBD, n=18) és a tumoros (AD és CRC, n=20) minták esetén is szignifikánsan magasabb metilációs értéket detektáltunk a CpG 1 esetén a CpG 2, a CpG 3, valamint az átlag metilációs értékekhez viszonyítva (\*\* $p \leq 0,01$ ).**

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

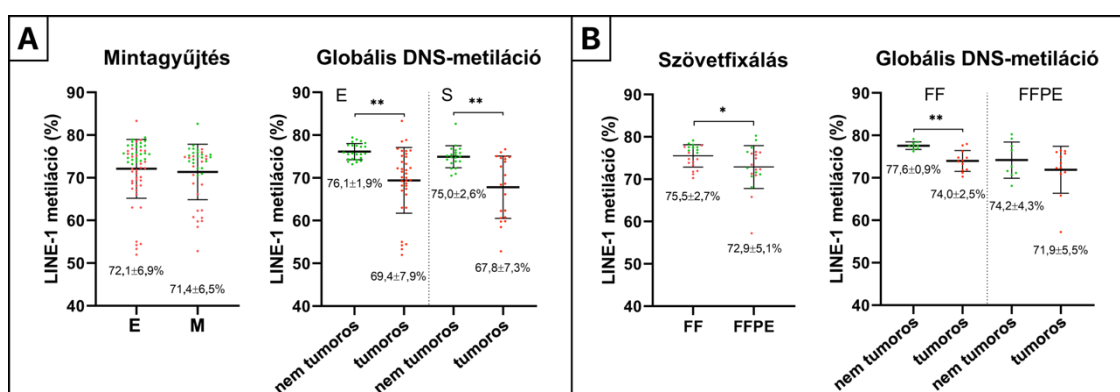
A különböző mintagyűjtési technikák (endoszkópos, műtéti) hatásának elemzése során CRC (tumoros) és CRC-NAT (nem tumoros) mintákat analizáltunk, míg a vastagbéliszövet minták fixálására használt friss-fagyasztás (FF), illetve formalin (FFPE) alkalmazásának LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálatát AD (tumoros) és N (nem tumoros) biopsziákon végeztük.

Mérsékelten magasabb LINE-1 metilációs szintet tapasztaltunk az endoszkóposan gyűjtött biopsziákban ( $72,1 \pm 6,9\%$ ) a műtéti mintákhoz ( $71,4 \pm 6,5\%$ ) hasonlítva (19. Ábra/A, bal oldal), míg szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt detektáltunk FFPE minták ( $72,9 \pm 5,1\%$ ) esetén FF biopsziákhoz ( $75,5 \pm 2,7\%$ ) képest (19. Ábra/B, bal oldal) ( $p \leq 0,05$ ). A megfigyelt különbségek miatt fontosnak véltük megvizsgálni, hogy a tumoros és nem tumoros minták között megfigyelt DNS-metilációs mintázat megjelenik-e a különböző technikákkal gyűjtött, valamint eltérő módon fixált tumor biopsziák esetén



is. Az endoszkópos, illetve műtéti biopsziák elemzése során mindkét mintagyűjtési technika esetén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt találtunk tumoros biopsziákban a nem tumoros mintákhoz képest (19. Ábra/A, jobb oldal). Friss-fagyasztással fixált mintákban szignifikánsan kisebb LINE-1 metilációt tapasztaltunk tumoros biopsziákban a nem tumoros mintákhoz viszonyítva, míg FFPE tumoros és nem tumoros csoportok között nem detektáltunk szignifikáns eltérést (19. Ábra/B, jobb oldal).

Az elemzett mintacsoportok CpG-pozícióinak szeparált metilációs értékeit a függelék F5., F6. táblázatában foglaltuk össze.



**19. Ábra. Az alkalmazott mintagyűjtési technika és fixálási módszer hatása a szöveti LINE-1 metilációs szintre.** A) Enyhén magasabb metilációs szintet tapasztaltunk az endoszkóposan gyűjtött minták (n=60) esetén a műtéti biopsziákhoz (n=42) képest (bal oldal). Szignifikánsan alacsonyabb globális DNS-metilációt találtunk tumoros mintákban a nem tumoros mintákhoz viszonyítva mindkét módszerrel gyűjtött biopsziák esetén (\*\* $p \leq 0,01$ ) (jobb oldal). B) FFPE mintákban (n=25) szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációs szintet figyeltünk meg az FF biopsziákhoz (n=25) hasonlítva ( $p \leq 0,05$ ) (bal oldal). Szignifikáns DNS-hipometilációt detektáltunk a tumoros vs. nem tumoros összehasonlításban FF minták esetén (\*\* $p \leq 0,01$ ), míg FFPE biopsziákban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (jobb oldal). E: endoszkópos minták, FF: friss-fagyasztott minták, FFPE: formalinfixált, paraffinba ágyazott minták, M: műtéti minták.

### 5.2.3. Különböző tárolási kondíciók hatása a LINE-1 metilációra

A kolorektális szövetbiopsziákból izolált DNS, illetve teljes vérminták eltérő tárolási körülményeinek LINE-1 metilációs eredményekre gyakorolt hatását

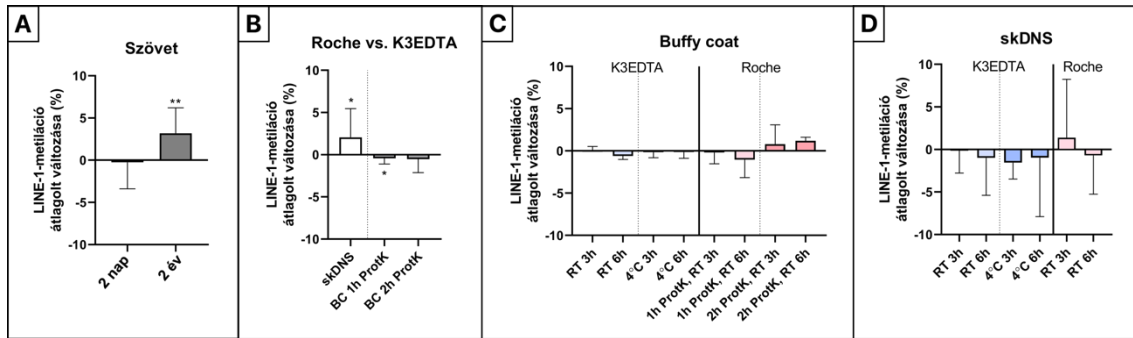
tanulmányoztuk. Az elemzések során az első és második vizsgálati időpont közötti átlag metilációs különbségeket tüntettük fel.

A vastagbéliszöveti minták -20 °C-on történő két napos tárolása nem okozott különbséget a LINE-1 metilációs értékek között (-0,9%), míg hosszútávú analízisünkben, a két év tárolás után elemzett párhuzamos DNS-minták szignifikánsan emelkedett (+3,2%) LINE-1 metilációval rendelkeztek az első mérési időponthoz képest ( $p \leq 0,01$ ) (20. Ábra/A).

A Roche vérvételi csövekbe gyűjtött vérminták vizsgálata során szignifikánsan emelkedett LINE-1 metilációt detektáltunk az skDNS-frakció (+2,1%) esetén, míg igen mérsékelt, de szignifikáns metilációs csökkenést tapasztaltunk a buffy coat mintákban (-0,4%) 1-órás ProtK emésztést követően ( $p \leq 0,05$ ) a konvencionális K3EDTA csövekbe gyűjtött vérmintákhoz képest. Azokban a buffy coat mintákban, amelyeket 2 órán keresztül inkubáltunk ProtK jelenlétében, nem szignifikáns LINE-1 metilációcsökkenést (-0,5%) figyeltünk meg (20. Ábra/B).

Standard K3EDTA vérvételi csövekbe gyűjtött teljes vérminták tárolása szobahőmérsékleten nem okozott lényeges LINE-1 metilációs eltérést buffy coat mintákban, 3 óra (+0,08%), illetve 6 óra (-0,6%) elteltével sem. Hasonló módon nem tapasztaltuk változást a 4 °C-on történő tárolást követően 3 (-0,2%), illetve 6 órával (-0,1%) végzett szeparálás esetén sem (20. ábra/C). Roche csövekbe vett vérmintákból végzett DNS izolálás során 1- (1h ProtK), illetve 2-órás ProtK-val (2h ProtK) történő emésztést is alkalmaztunk. Az 1h ProtK minták esetén -0,2%-os, valamint -1,0%-os eltérést detektáltunk a teljes vérminták 3, valamint 6 órás tárolása után. A 2h ProtK mintákban 3 óra elteltével +0,8%-os, továbbá 6 óra elteltével +1,2%-os növekedést figyeltünk meg a LINE-1 metilációs értékekben (20. Ábra/C). Az skDNS LINE-1 metiláció analízise során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést sem a tárolás hosszától, sem a tárolási hőmérséklettől függően K3EDTA vérvételi csövek (RT 3h: -0,1%, 6h: -1,0%; 4 °C 3h: -1,6%, 6h: -1,0%), illetve Roche csövek esetén sem (RT 3h: +1,4%, RT 6h: -0,7%) (20. Ábra/D).

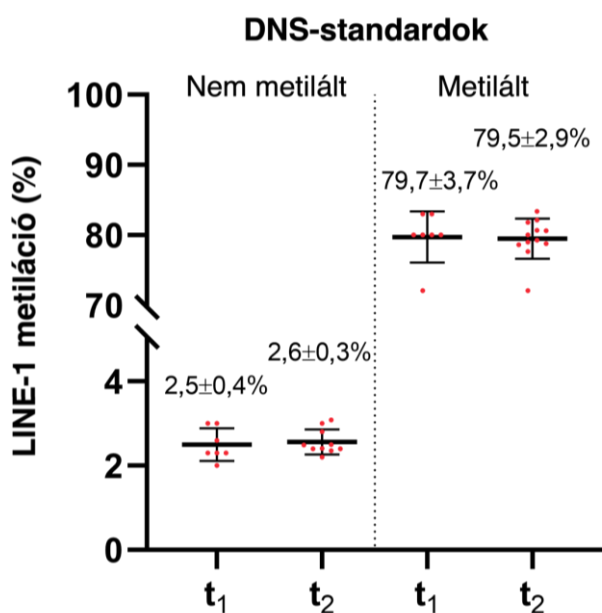
Az elemzett mintacsoportok CpG-pozícióinak szeparált metilációs értékeit a függelék F7., F8., F9. táblázatában foglaltuk össze.



**20. Ábra. A különböző tárolási körülmények hatása a LINE-1 promóterének metilációjára.** A) Rövid ideig tartó (2 nap,  $n=26$ )  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tárolás esetén nem tapasztaltunk szignifikáns LINE-1 metilációs eltérést ( $-0,9\%$ ), míg hosszú távú (2 év,  $n=48$ ) tárolást követően szignifikáns,  $+3,2\%$ -os emelkedést figyeltünk meg a LINE-1 metilációs értékekben az első mérési időponthoz hasonlítva (\*\* $p\leq 0,01$ ). B) A vérévételi csövek típusának vizsgálatában (K3EDTA,  $n=12$  és Roche,  $n=12$ ) a Roche csövekbe gyűjtött teljes vérminták esetén szignifikáns LINE-1 metiláció változást detektáltunk az skDNS ( $+2,1\%$ ) és 1h ProtK buffy coat ( $-0,4\%$ ) mintákban a standard K3EDTA csövekhez viszonyítva (\* $p\leq 0,05$ ). Nem szignifikáns, enyhe DNS-metiláció csökkenést mértünk a 2h ProtK buffy coat frakcióban. C) K3EDTA csövekből szeparált buffy coat minták ( $n=20$ ) analízise során nem tapasztaltunk szignifikáns metilációs eltérést sem a teljes vér tárolásának hosszától, sem a tárolás hőmérsékletétől függően (RT 3h:  $+0,08\%$ , 6h:  $-0,6\%$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  3h:  $-0,2\%$ , 6h:  $-0,1\%$ ). Roche vérévételi csövekben ( $n=20$ ), a tárolás hossza szintén nem befolyásolta a LINE-1 metilációt, továbbá a ProtK inkubáció hosszának függvényében sem találtunk eltérést (1h ProtK, RT 3h:  $-0,2\%$ , RT 6h:  $-1\%$ ; 2h ProtK, RT 3h:  $+0,8\%$ , RT 6h:  $+1,2\%$ ). D) A standard K3EDTA csövekbe vett vérminták esetében ( $n=20$ ) az skDNS LINE-1 metilációjának enyhe csökkenését figyeltük meg mindkét vizsgált tárolási hőmérséklet esetén (RT 3h:  $-0,1\%$ , 6h:  $-1\%$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  3h:  $-1,6\%$ , 6h:  $-1\%$ ). A Roche gyűjtőcsövekből izolált skDNS mintákban ( $n=12$ )  $+1,4\%$ -os, illetve  $-0,7\%$ -os metilációs különbségeket detektáltunk 3, illetve 6 órás RT-tárolást követően. 1h ProtK: 1 óra ProtK emésztés, 2h ProtK: 2 óra ProtK emésztés, 3h: buffy coat- és plazmaszeparálás 3 óra tárolás után, 6h: buffy coat- és plazmaszeparálás 6 óra tárolás után, RT: szobahőmérséklet, skDNS: sejten kívüli szabad DNS.

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

Hosszú távú  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tárolás LINE-1 metilációra gyakorolt hatását biszulfítkonvertált, metilált és nem metilált standard DNS-minták esetén is megvizsgáltuk. Két év tárolás után elvégzett elemzések eredményei nem mutattak szignifikáns eltérést az első mérésekhez képest a metilált, illetve nem metilált kontrollok esetén sem (21. Ábra). A metilált standardok esetében nagyobb szórás volt tapasztalható a nem metilált minták szórásához viszonyítva.



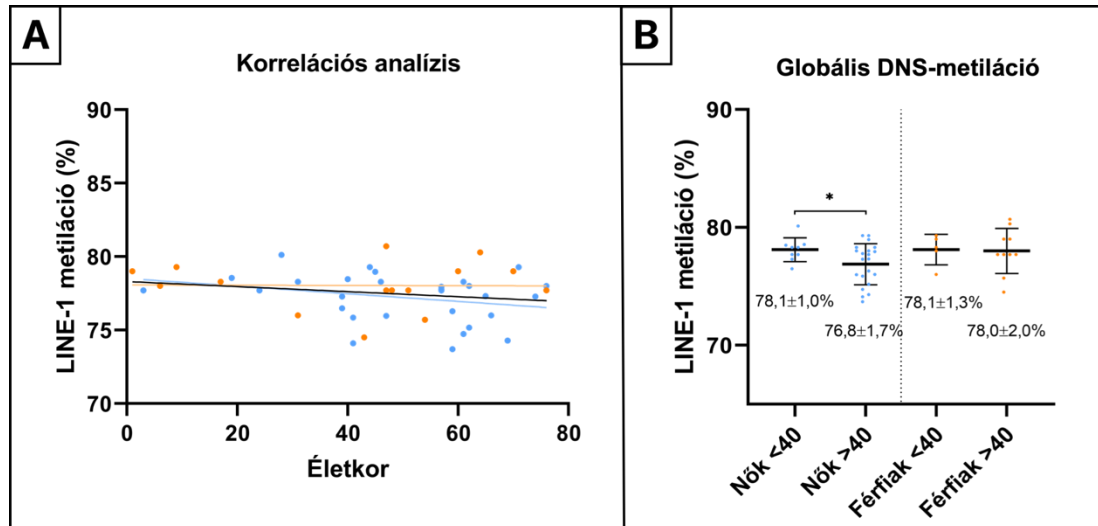
**21. Ábra. Biszulfítkonvertált, metilált és nem metilált DNS-standardok LINE-1 metilációja.** Két éven át tartó  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tárolást követően nem tapasztaltunk szignifikáns LINE-1 metilációs eltérést sem a metilált, sem a nem metilált kontrollok esetén. A metilációs értékek szórásai nagyobbak adódtak a metilált minták esetén. t<sub>1</sub>: első mérési időpont t<sub>2</sub>: második mérési időpont.

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

Az életkor LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata során nem tapasztaltunk korrelációt egészséges nő ( $\rho=-0,3$ ;  $p=0,14$ ), illetve férfi ( $\rho=-0,02$ ;  $p=0,94$ ) páciensektől gyűjtött vastagbéliszöveti mintákban, valamint az adatok összevont elemzésekor sem ( $\rho=-0,2$ ;  $p=0,25$ ) (22. Ábra/A). Azonban szignifikánsan alacsonyabb

LINE-1 metilációt figyeltünk meg 40 évnél idősebb női páciensek ( $76,8 \pm 1,7\%$ ) esetén a 40 évnél fiatalabbakhoz ( $78,1 \pm 1,0\%$ ) képest ( $p \leq 0,05$ ) (22. Ábra/B). Nemek szerinti csoportosítás esetén szignifikáns eltérést nem találtunk (22. Ábra/B).

Az elemzett mintacsoportok CpG-pozícióinak szeparált metilációs értékeit a függelék F10. táblázatában foglaltuk össze.



**22. Ábra. LINE-1 metiláció kor- és nemfüggésének elemzése vastagbéliszöveti mintákban.** A) Vizsgálatunk során nem figyeltünk meg szignifikáns korrelációt az életkor és a LINE-1 promóterének metilációs szintje között nők ( $\rho = -0,3$ ;  $p = 0,14$ ; kék), illetve férfiak ( $\rho = -0,02$ ;  $p = 0,94$ ; narancssárga), valamint az összesített adatszett esetén sem ( $\rho = -0,2$ ;  $p = 0,25$ ; fekete). B) Továbbá nemek között sem detektáltunk szignifikáns metilációs különbséget ( $n_{\text{nők}}=30$ ,  $n_{\text{férfiak}}=15$ ). Szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt tapasztaltunk 40 évnél idősebb női páciensektől ( $76,8 \pm 1,7\%$ ,  $n=21$ ) gyűjtött minták esetén a 40 évnél fiatalabb személyektől ( $78,1 \pm 1,0\%$ ,  $n=9$ ) nyertekhez képest ( $p \leq 0,05$ ) (jobb oldal). kék: nő páciensektől gyűjtött minták, narancssárga: férfi páciensektől gyűjtött minták.

## 6. Megbeszélés

Az epigenetika fogalmának bevezetését követően hamar ismertté vált, hogy a különböző tumorok kialakulásának hátterében a genetikai mutációk mellett epigenetikai eltérések is állhatnak. A globális DNS-hipometiláció az elsőként leírt epimutáció rákos kórfolyamatokban (111). Ez a genomszinten értelmezendő molekuláris változás, főként az intergénikus régiókban elhelyezkedő mobilis genetikai elemek metilációs szintjének csökkenését jelenti (101). Az alacsonyabb metilációs szint következtében a mobilis genetikai elemek reaktivációja tapasztalható (101). A transzpozábilis elemek közül kiemelten fontosak a LINE-1 retrotranszpozonok, amelyek kópiái a humán genom megközelítőleg 17%-át adják (113). Véletlenszerű áthelyeződésük mutációk felhalmozódásához és kromoszomális instabilitáshoz vezethet (117–119), amely a vastagbél-daganatos esetek több mint 80%-ában korai molekuláris esemény (4,5). Ehhez kapcsolódóan PhD-munkám első részében a globális DNS-metilációs mintázat változását vizsgáltuk egészséges, vastagbél-tumoros, illetve gyulladással járó bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött vastagbél-szövet biopsziákban és plazmamintákban.

Miután megfigyeltük a globális DNS-hipometiláció jelenségét kolorektális tumorokban az ép mintákhoz képest, célul tűztük ki ezen epigenetikai mintázatváltozás kialakulása mögött álló lehetséges molekuláris eltérések vizsgálatát. Analizáltuk a DNS-metiláció folyamatához köthető metilázok, demetilázok, regulátor fehérjék, valamint a folsavreceptorok és az 1C metabolizmus enzimrendszerének mRNS-expressziós profilját. Továbbá arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a folsav- és metioninciklust összekötő *MTHFR* gén gyakori mutációi esetén detektálható-e a globális DNS-metilációs mintázat megváltozása egészséges, adenómás és rákos páciensek szövetmintáiban. Végezetül fontosnak tartottuk a metildonor molekulák *in situ* elemzését tumor-NAT tranzíciós zónát tartalmazó vastagbél-tumoros szöveti metszeteken. A vizsgálat során csökkenő folsav- és SAM-mennyiséget figyeltünk meg kolorektális adenóma és karcinóma mintákban az ép területekhez képest a globális DNS-metilációs szint változásával összhangban.

A vérplazmából izolálható skDNS frakció analízise számos kutatás tárgyát képezi, ugyanis a tumor szövetéből véráramba jutó DNS-molekulák hordozzák a tumorra specifikus mutációkat és epimutációkat (163). A plazmaminták LINE-1 biszulfid-

piroszekvenálása során globális DNS-hipometilációt nem csak vastagbélrákban szenvedő páciensektől gyűjtött vérmintákban tapasztaltunk, hanem már adenómás személyek esetén is az egészséges egyénekhez viszonyítva. Ezáltal a LINE-1 metiláció a vastagbél-daganatok klinikai utánkövetésére és a betegek szűrésére alkalmas módszer fejlesztésének alapjaként szolgálhat minimálisan invazív módon nyerhető vérplazmamintákból. A technika specificitását növelheti az a megfigyelésünk, miszerint IBD esetén nem tapasztaltunk szignifikáns globális DNS-metilációs eltérést sem vastagbél-szöveti, sem plazmamintákban.

Az esetleges klinikai alkalmazás esetén és az alap kutatás területén is kiemelten fontos a globális DNS-metilációs mérések reprodukálhatósága, így PhD-munkám második felében olyan metodikai és biológiai faktorokat elemeztünk, amelyek a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás eredményeit befolyásolhatják. Ezeket a vizsgálatokat szintén kolorektális szövet- és vérmintákon végeztük el.

## **6.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának háttérében álló lehetséges okok feltérképezése**

### **6.1.1. A globális DNS-metiláció vizsgálata vastagbél-szövet- és plazmamintákban LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással**

Számos tumortípus, köztük a jó- és rosszindulatú kolorektális daganatok esetén is megfigyelhető a globális DNS-hipometiláció jelensége az ép biopsziapárokhoz képest (192,193). A genom szintű DNS-metiláció szintje eltérő tartományban található a különböző típusú egészséges, illetve tumoros szövetek esetén is (192). Chalitchagorn és mtsai. tanulmánya szerint az egészséges vastagbél metilációs szintjéhez viszonyítva többek között az egészséges máj és húgyhólyag globális DNS-metilációja enyhén magasabb értékeket vesz fel, míg a vese alacsonyabb szintű metilációval rendelkezik (192). Továbbá párosított tumoros minták vizsgálata során például a limfóma és a vesesejtes karcinóma minták nem mutattak jelentős metilációs eltérést az egészséges biopsziákhoz képest. A szignifikáns globális DNS-hipometilációval rendelkező tumorok esetén kis, valamint közepesen erős mértékű metilációcsökkenéssel jellemezhető fő csoportok különíthetők el. Előbbi csoportba sorolható például a prosztaták, míg az

útobbi részét többek között a fej-nyaki daganatok, gyomor-, valamint vastagbélrák képezik (192).

Kutatásunkba bevont vastagbéliszöveti minták vizsgálata során szignifikáns globális DNS-hipometilációt tapasztaltunk mind az AD, mind a CRC biopsziákban az N, illetve párosított AD-NAT és CRC-NAT mintákhoz képest. Továbbá az irodalmi adatokkal összhangban AD-NAT és CRC-NAT csoportokban szintén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt találtunk az egészséges mintákhoz hasonlítva (194–196). Korábbi eredményeknek megfelelően (197) a LINE-1 metilációs értékek között magas szórást figyeltünk meg tumoros mintákban, amely összefüggésben állhat az intratumorális heterogenitással (198,199). Szignifikáns LINE-1 hipometilációt detektáltunk a TA és TVA mintákban is az N biopsziákhoz viszonyítva, valamint a TVA biopsziákban is szignifikánsan kisebb metilációs szintet mértünk a TA csoporthoz képest. Ezen eredményeinktől eltérően Jiang és mtsai. nem találtak LINE-1 metilációs különbséget a TVA és TA minták között (200). Több villózus komponenst tartalmazó adenómákból nagyobb valószínűséggel következik be rákos transzformáció (201), így az általunk tapasztalt eredmény feltételezhetően a daganatos kórfolyamat előrehaladtával egyre növekvő mértékű hipometilációval hozható összefüggésbe (193,202). Különböző stádiumú CRC-k elemzése során szignifikáns LINE-1 metilációs csökkenést detektáltunk a korai és kései CRC csoportokban az N mintákhoz képest, valamint mérsékelten alacsonyabb metilációs szintet a kései CRC-s biopsziákban a korai stádiumú mintákhoz hasonlítva. Ezen eredményeink szintén összhangban vannak azzal, hogy a globális DNS-metilációs szint folyamatosan csökken a CRC progressziója során (121,202).

A gyulladással járó bélbetegségek molekuláris vizsgálata kulcsfontosságú az IBD egyre növekvő előfordulási gyakorisága és a CRC kialakulásával való kapcsolata miatt (203–205). Glória és mtsai. globális DNS-hipometilációt írtak le UC-s betegek végbélmintáiban az egészséges személyekhez képest (206). Ettől eltérően kutatásunkban vastagbéliszöveti minták vizsgálata során nem figyeltünk meg jelentős LINE-1 metilációs változást az IBD vs. N összehasonlításban. AD és CRC csoportok azonban szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációval rendelkeztek az IBD-s páciensek szövetmintáihoz viszonyítva. Eredményeinkhez hasonlóan gyomorrákos biopsziákban szignifikánsan csökkent LINE-1 metilációs szint detektálható a párosított NAT biopsziákhoz képest, de



az ép gyomor-, NAT- és krónikus gastritis szövetminták között nem tapasztalható változás (207).

Nagai és mtsai. figyeltek meg elsőként szignifikáns LINE-1 hipometilációt CRC-s plazmamintákban egészséges személyekhez viszonyítva. Eredményeik felvetették a LINE-1 metilációs szint lehetséges biomarkerként való alkalmazását a CRC korai kimutatásában folyadékbiopsziák használatával (208). Kutatócsoportunk friss tanulmányában onkológiai kezelés alatt álló CRC-s páciensektől gyűjtött vérminták LINE-1 metilációját elemeztük (209). A vizsgálat során szignifikáns metilációcsökkenést mértünk azon személyek vérmintáiban, akiknél a daganat progrediált, míg szignifikáns LINE-1 metilációnövekedést detektáltunk remisszió esetén (209). PhD-munkámban célul tűztük ki az egészséges, kolorektális adenómás, karcinómás és gyulladós bélbetegségben szenvedő páciensek LINE-1 metilációjának elemzését plazmamintákból. Kiemelendő, hogy a CRC-s minták mellett az AD-s csoportban is szignifikáns hipometilációt találtunk az egészséges kontrollokhöz képest. Továbbá a gyulladásban lévő kolorektális szövetmintákban tapasztaltakhoz hasonlóan, az IBD-s betegek plazmamintáiban sem detektáltunk szignifikáns metilációváltozást az egészséges személyekhez viszonyítva. Ezen eredmények és a fent említett irodalmi adatok alapján a globális DNS-hipometiláció inkább jellemző daganatokra, mint a gyulladós folyamatokra, ami ígéretes lehet egy, a LINE-1 metilációs státuszán alapuló, a vastagbél-daganatok klinikai utánkövetésére és a betegek szűrésére alkalmas eljárás kidolgozásában.

### **6.1.2. A DNS-metiláció kialakulásának hátterében álló lehetséges okok elemzése**

#### ***6.1.2.1. A DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó enzimek in silico génexpressziós és immunhisztokémiai vizsgálata***

A globális DNS-hipometiláció széles körben kutatott epigenetikai változás, viszont kialakulásának molekuláris háttere még nem teljesen ismert. A megfelelő sejtspecifikus DNS-metilációs mintázat fenntartásához szükséges a metiláz és demetiláz enzimek, illetve az 1C ciklus enzimrendszerének megfelelő működése, továbbá befolyásolják a különböző transzkripciós faktorok, hosszú nem-kódoló RNS-ek, illetve a metildonor molekulák mennyisége is. Ezeket a faktorokat érintő eltérések aberráns

metilációs mintázat kialakulásához vezethetnek (91). PhD-munkám következő részében így arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a kolorektális normál-adenóma-karcinóma szekvencia mentén bekövetkező transzkriptomikai eltérések, metildonor molekulák mennyiségének esetleges változása, valamint az *MTHFR* gén frekventált mutációinak jelenléte összefüggésbe hozható-e a globális DNS-hipometiláció kialakulásával.

A transzkriptomikai eltérések tanulmányozását célzó vizsgálatunk során a munkacsoportunk által korábban elvégzett HTA 2.0 RNS microarray eredményeinek bioinformatikai újraelemzését végeztük el (190). A DNS-metilációhoz köthető enzimszereket vontuk be az analízisünkbe, amelyek közül az alábbiakban azokat a géneket tárgyaljuk, amelyek expressziós változása megfelelt az *in silico* vizsgálati kritériumainknak. A demetiláz enzimek fokozott aktivitása során a DNS-metilációs szint csökkenése figyelhető meg (210), így fontosnak véltük a TET és APOBEC enzimsaládok mRNS-expressziójának elemzését. A TET enzimek az 5mC-t 5hmC, 5fC és 5kaC formákká alakítják (48,49), míg az APOBEC enzimsalád tagjai dezamináció révén 5mC-ből timint hoznak létre (50,55). Az így kapott nukleotidokat a sejt hibajavító rendszere felismeri és citozin tartalmú nukleotidokra cseréli őket (50,53). Analízisünkben a vizsgált demetiláz enzimek közül az *APOBEC1* és *APOBEC3B* gének esetén találtunk szignifikáns eltérést, miszerint az *APOBEC1* transzkriptumszintje szignifikánsan magasabbnak, illetve az *APOBEC3B* átíródása szignifikánsan alacsonyabbnak adódott AD mintákban az ép biopsziákhoz képest. Korábbi tanulmányok az *APOBEC1* egy katalitikusan inaktív formáját kódoló, rövidebb splice-variánsának szignifikánsan magasabb expresszióját írták le vastagbélrákban (211,212). Ebből arra következtetünk, hogy az általunk végzett elemzés során tapasztalt emelkedett mRNS-szint AD mintákban nem feltétlenül kapcsolható a globális DNS-hipometiláció kialakulásához. Burns és mtsai. CRC minták esetén eredményeinkhez hasonlóan csökkent *APOBEC3B* átíródást írtak le az egészséges biopsziákhoz viszonyítva (213). Korábbi tanulmányok különböző rákos, illetve embionális sejtvonalakban megfigyelték a LINE-1 szakaszok áthelyeződésének gátlását az APOBEC3 enzimek működésének következtében. A dezaminációtól, így demetilációtól független mechanizmus pontosan nem ismert, Stenglein és mtsai. az APOBEC3 fehérjék ORFp2-vel alkotott komplexét feltételezik a háttérben, ami megakadályozza a LINE-1 szekvenciák inszercióját (214,215). Következésképpen az általunk is tapasztalt *APOBEC3B* alulexpresszió hozzájárulhat a

LINE-1 szakaszok felszaporodásához, de eddigi irodalmi adatok alapján nem a DNS-metilációs szint csökkenése révén, hanem más, eddig pontosan nem tisztázott mechanizmusok által.

Az 1C ciklus elemzése különösen fontos, ugyanis ebben a metabolikus folyamatban szintetizálódik a SAM, amely egy univerzális metildonor molekula (62). Az 1C metabolizmus központi szereplője a folsav, amely az egy szénatomos töredékek, így a metilcsoport szállítómolekulájaként is szolgál. Különböző oxidációs formáin (5,10-metilén-THF, 10-formil-THF, 5-metil-THF) keresztül kapcsolódik a nukleinsavszintézishez, illetve a metioninciklushoz, amelyben a SAM keletkezik (62). Mivel a metilcsoport közvetlenül a SAM-ról kapcsolódik az akceptor molekulákra (216), az 1C metabolizmus enzimszisztémájának megfelelő működése elengedhetetlen a metilációs folyamatokhoz. Az 1C ciklus fehérjéinek transzkriptomikai elemzésében a vizsgálati kritériumoknak megfelelő expressziós változással az *SHMT2*, *MTHFD1*, *MTHFD2*, *ATIC* és *GART* gének rendelkeztek. Az *SHMT2*, *MTHFD1* és *MTHFD2* a THF, 5,10-metil-THF, 10-formil-THF átalakulásokat katalizálják, míg az *ATIC* és *GART* gének a 10-formil-THF-et kapcsolják a purinszintézishez (62). Mindegyik gén esetében szignifikánsan növekedett mRNS-expressziós szintet tapasztaltunk AD és CRC mintákban az N biopsziákhoz hasonlítva. Az 1C ciklusban szereplő gének fokozott kifejeződését több ráktípusban, köztük vastagbél-daganatokban is leírták, amely jelenség a folyamatosan osztódó sejtek megnövekedett nukleotidigényével magyarázható (217).

A FR $\beta$  és a DNMT enzimek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a DNS-metiláció folyamatában. A FR $\beta$  egy a folsavtranszportért felelős receptor (218), míg a DNMT enzimek a citozin nukleobázis és a metilcsoport közötti kovalens kötés létrejöttének fő katalizátorai (45). Microarray analízisünk során a FR $\beta$ -t kódoló *FOLR2* gén expressziója szignifikánsan csökkent AD és CRC mintákban az ép biopsziákhoz képest. A DNMT enzimek közül a *DNMT1* mRNS-szintje szignifikánsan emelkedett a CRC vs. N összehasonlításban, míg a *DNMT3A* és *3B* gének kifejeződése nem változott. A génexpressziós elemzések mellett immunhisztokémiai módszerrel is meghatároztuk az imént említett fehérjék kifejeződését. A DNMT1 a DNS-metiláció fenntartásáért felelős enzim (47), míg a DNMT3A és 3B *de novo* aktivitású fehérjék (46). Habár egy öt CRC-s sejtvonalat elemző tanulmány szerint a *DNMT1*, *3A* és *3B* mRNS-expressziója pozitív

korrelációt mutat a globális DNS-metiláció mértékével (219), eredményeink a DNMT1 enzim fehérjeexpressziójának szignifikáns emelkedését igazolták immunhisztokémiával a CRC csoportban a NAT régiókhoz viszonyítva, míg a DNMT3A és 3B fehérjék esetében nem találtunk szignifikáns változást. Korábbi publikációk eredményei szerint szignifikánsan növekedett DNMT1 expresszió detektálható a DNS-metiláció gátlása esetén, tehát ezen tanulmányok alapján a DNMT1 emelkedett transzkriptumszintje része lehet a gátolt DNS-metilációra adott visszacsatoló válaszmechanizmusnak (220–222). Továbbá humán glióma vizsgálatában megfigyelték a DNMT1 enzimek olyan poszttranszlációs módosítását, amely az enzimek DNS-hez való kötődését gyengítik, hozzájárulva a DNS-hipometiláció, így a rák kialakulásához (223,224). Ez utóbbi eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a magas DNMT1 expresszió mellett is megvalósulhat az enzim nem megfelelő működése, ami elősegítheti a DNS demetilációját.

A folátreceptorokat kódoló gének, így a *FOLR2* vizsgálata nagy jelentőséggel bír, ugyanis csökkent kifejeződése alacsonyabb FA és SAM szinthez vezethet (225), ami hatást gyakorolhat a DNS-metilációs mintázatra (91). A *FOLR2* esetében csökkent mRNS-expressziót találtunk AD és CRC biopsziákban az egészséges szövetekhez képest, amely eredményünket immunhisztokémiai festésekkel igazoltuk. Eredményeinkhez hasonlóan de Boer és mtsai. a rákos hámsejtek gyenge FR $\beta$  festődési intenzitását tapasztalták (226).

#### **6.1.2.2. Az *MTHFR* gén mutációinak hatása a globális DNS-metilációs mintázatra**

Az MTHFR enzim egy kulcsfontosságú fehérje az 1C metabolizmusban, ugyanis katalízise által 5,10-metilén-THF 5-metil-THF-fé alakul. Az 5-metil-THF-ről kapcsolódik a metilcsoport a homociszteinre metionint hozva létre, amely kruciális a SAM szintézisében (62). Az *MTHFR* gén gyakori mutációinak jelenléte és a globális DNS-metilációs szint közötti összefüggés vizsgálata különösen fontos, hiszen a C677T és A1298C mutációk már heterozigóta formában jelentősen csökkent enzimaktiváshoz vezetnek (72), ami a SAM korlátozott elérhetőségét eredményezheti (71). Egészséges vastagbéliszöveti minták elemzése során nem tapasztaltunk szignifikáns globális DNS-metilációs változást egyik heterozigóta mutáns genotípus esetén sem a vad típusokhoz

képest, összhangban egy a C677T hetero- és homozigóta mutációinak hatását analizáló tanulmány eredményeivel (227). Azonban egy korábbi vizsgálatban magasabb LINE-1 metilációt írtak le olyan normál vastagbéliszövet minták esetén, amelyekben magasabb MTHFR aktivitás volt mérhető (228). Továbbá az *MTHFR* gént érintő mutációk DNS-metilációt befolyásoló hatását támogatja Paz és mtsai. eredményei is, miszerint C677T homo- és heterozigóta mutációk jelenléte erős asszociációt mutattak CRC-s páciensek NAT mintáinak alacsony globális DNS-metilációs szintjével (229).

Szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet tapasztaltunk 677CT és 1298AC mutáns AD biopsziákban a vad típusúakhoz képest, továbbá érdekes módon mérsékelten magasabb metilációt detektáltunk CRC mintákban mindkét heterozigóta mutáció esetén a vad típusú szövetbiopsziákhoz hasonlítva. Egy szintén CRC-s eseteket vizsgáló tanulmány nem talált LINE-1 metiláció eltérést 677CT és 1298AC mutációk esetén (230), viszont egy friss kutatásban az A1298C hetero- és homozigóta mutáns CRC-s szövetminták alacsonyabb globális metilációját figyelték meg a vad típusúakhoz viszonyítva (231). Sohn és mtsai. HCT116 vastagbélrák sejtvonalakon végzett elemzése során szignifikánsan magasabb DNS-metilációs szintet találtak C677T heterozigóta variáns jelenléte esetén a vad típusú sejtekhez képest elegendő vagy nagy mennyiségű folátadás mellett (232). Ezzel szemben alacsony folátszint alkalmazásakor szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet detektáltak a heterozigóta mutáns sejtekben a vad típusúakhoz hasonlítva (232). Egy metaanalízis alapján az *MTHFR* gén általunk is vizsgált heterozigóta mutációi és a kolorektális adenómák megjelenésének kockázata között nincs kapcsolat (233), míg korábbi kutatások C677T homozigótaság mellett egyaránt megfigyelték az összefüggés hiányát (234,235), valamint az adenómák nagyobb kialakulási valószínűségét alacsony folátszint mellett (236,237). Továbbá - különös módon - mindkét heterozigóta variáns esetén (233,238), valamint elegendő folátszint mellett a C677T homozigóta mutációjakor is a CRC kialakulásának alacsonyabb kockázatát detektálták (239). Ezen publikációk folsavszint esetleges hatásával kapcsolatos eredményei magyarázatként szolgálhatnak arra, hogy a fent említett munkák, valamint az általunk is elvégzett LINE-1 metiláció és *MTHFR* státusz közötti összefüggés elemzése nem egybehangzó válaszokat eredményezett.

### ***6.1.2.3. A metildonor molekulák mennyiségének vizsgálata vastagbélszövetben immunhisztokémiával***

Végezetül a metildonor molekulák (folsav és SAM) *in situ* vastagbélszöveti elérhetőségét vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel kolorektális adenómás és karcinómás szöveti metszeteken. Párhuzamosan ugyanazon biológiai minta globális DNS-metilációs változását is elemeztük 5mC-jelöléssel.

A folsav- és SAM-jelölés csökkent intenzitást mutatott az AD-s és CRC-s zónákban a NAT területekhez képest, valamint csökkenő 5mC-jelölődést, azaz globális DNS-hipometilációt tapasztaltunk a tumoros régiókban az ép zónákhoz viszonyítva. Eredményeinkkel összhangban McGlynn és mtsai. alacsonyabb folát elérhetőséget, valamint szignifikáns globális DNS-hipometilációt figyeltek meg adenóma szöveti mintákban, a NAT területekhez, illetve egészséges személyektől gyűjtött mintákhoz hasonlítva, amely alapján úgy vélik, hogy az alacsonyabb folsavszint hozzájárulhat az adenómák kialakulásához (240). Továbbá Alonso-Aperte és mtsai. a vastagbél neoplasztikus nyálkahártyájában alacsonyabb folát mennyiséget és csökkent SAM/SAH arányt mutatott ki a normál mintákhoz képest, amely utóbbi csökkent metilációs potenciált jelent (241), és hozzájárulhat a globális DNS-hipometiláció kialakulásához (242). A tumoros területeken tapasztalt alacsonyabb SAM-mennyiség magyarázataként szolgálhat a detektált alacsonyabb folsavszint, ugyanis a folsav szállítja az egyszénatomos töredékeket a folátcikluson át a metioninciklusba (62). Tehát a folsav alacsonyabb mennyisége a SAM csökkenő szintjén keresztül hipometiláció kialakulásához vezethet (243,244). Mindezek mellett a SAM regenerációjának elmaradása esetén felhalmozódó SAH is hozzájárulhat az alacsonyabb DNS-metilációhoz azáltal, hogy a SAH molekula csökkenti a DNMT enzimek aktivitását (245,246).

Számos kutatás fókuszál a metildonor molekulák hiányának és pótlásának DNS- és LINE-1 metilációra gyakorolt hatására, azonban az eredmények ellentmondásosak (247). Hübner, valamint Figueriedo és mtsai. eredményei alapján a folátsupplementáció nem okozott szignifikáns LINE-1 metiláció változást egészséges vastagbélszövetben (248,249). Azonban Pufulete és mtsai. enyhe pozitív korrelációt figyeltek meg a szérumból folátszintje, illetve a DNS-metiláció mértéke között ép vastagbélszövetben (250), valamint korábbi tanulmányok alacsony folát elérhetőség és a globális DNS-

hipometiláció közötti asszociációt írtak le egészséges humán vastagbélhám eredetű sejtvonalban (251), illetve limfocitákban (245,252). Munkacsoportunk által vastagbélrák sejtvonalakon (HT-29 és SW480) végzett folsav- és SAM-pótlás szignifikáns DNS-metilációs, illetve transzkriptomikai változásokat eredményezett, továbbá befolyásolta a sejtek proliferációját, viabilitását, valamint genetikai stabilitását is (253,254). A fiziológias mennyiségű folsavadás a HT-29 sejtek proliferációjának és viabilitásának növekedését eredményezte, a genom instabilitását pedig az alkalmazott fiziológias, illetve szuprafiziológias dózisban is csökkentette (253). Azonban a SAM-pótlás lassította mindkét sejtvonal proliferációját, illetve növelte a genetikai stabilitását, az SW480 sejtekben jelentősebb mértékben (254). A két sejtvonalban megfigyelt eltérő eredmények mögött a sejtvonalak különböző genetikai háttere állhat (254). Mindkét kezelőszer használata során a várt metilációs folyamatok mellett demetilációt is detektáltunk, a metilálódott és demetilálódott CpG-helyek mennyisége körülbelül egyforma volt a két sejtvonal esetében (253,254). A génexpressziós eredmények közül kiemelendő, hogy a SAM-kezelés következtében számos olyan gén kifejeződése csökkent, amely szerepet játszik az EMT, a sejtmigráció és a metasztázis folyamatában, tehát a daganatok progressziójában (254).

Habár a legfrissebb irodalmi adatok szerint a metildonor molekulák hiányának, illetve pótlásának hatása a DNS-metilációs szintre nem egyértelmű, PhD-munkám eredményei alapján a metildonorok hiánya negatív hatást gyakorolhat a globális DNS-metiláció mértékére.

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

A LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás egy költséghatékony, megbízható (144,151), széles körben alkalmazott módszer a kutatásban (152–158), valamint a LINE-1 szakaszok metilációs szintje prognosztikai és diagnosztikai szempontból is jelentős információt hordoz (208,209,255), így különösen fontos a technika reprodukálhatóságának, illetve pontosságának növelése.

Aparicio és mtsai. által publikált tanulmány a LINE-1 biszulfít-piroszekvenálás megbízhatóságát vizsgálta két mintagyűjtési időpont között vérplazmából, perifériás mononukleáris vérsejtekből, nyálból, valamint szájnyálkahártya sejtekből izolált DNS-mintákban (151). Minden DNS-minta esetén két piroszekvenálási reakciót végeztek, illetve minden reakcióban egy mintából két technikai párhuzamost alkalmaztak. Nem tapasztaltak LINE-1 metilációs eltérést az időpontok között, valamint eredményeik alapján az egy futáson belül mért technikai párhuzamosok metilációja közötti szórás kisebbnek adódott a két külön futásban analizált párhuzamosok esetén detektálathoz képest (151). Irahara és mtsai. a LINE-1 biszulfít-piroszekvenálás pontosságát FFPE CRC, NAT, valamint buffy coat mintákon elemezték, amelyek közül a CRC minták LINE-1 metilációját makro- és lézer-mikrodisszekció által gyűjtött biopsziákban is analizálták (162). Vizsgálatukban egy mintából hét biszulfítkonverziót, majd két biszulfítkonvertált DNS-mintából hét PCR reakciót végeztek el. Végző soron az amplikonokat piroszekvenálták. Mind a biszulfítkonverziós, mind a PCR reakciók összehasonlítása során érdekes módon a lézer-mikrodisszekció által nyert CRC minták szórása adódott a legnagyobb. Eredményeik alapján a makrodisszekált CRC, NAT, valamint buffy coat mintákban egy biszulfítkonverzió, egy PCR és piroszekvenálási reakció elvégzése megbízható eredményeket szolgál, azonban párhuzamos minták mérésével a pontosság növelhető volt (162).

PhD-munkám ezen részében célunk a jelenlegi irodalmi adatok bővítése egy átfogó analízis készítésével, azon metodikai faktorok elemzéséről, amelyek hatást gyakorolhatnak a LINE-1 biszulfít-piroszekvenálás által kapott globális DNS-metilációs eredményeinkre. Vizsgálatainkat vastagbéliszöveti biopsziákon, illetve teljes vérből nyert buffy coat és skDNS-mintákon végeztük. A változók megválasztásakor a LINE-1 biszulfít-piroszekvenálás kutatási, valamint esetleges klinikai célú felhasználása során felmerülő szempontokat vettük figyelembe. Doktori munkám során végzett vizsgálatokban elemeztük a Pyromark Q24 CpG LINE-1 esszé által mért három CpG-pozíció szeparált, valamint átlagolt metilációs értékeit. Továbbá összevetettük a különböző mintavételezés által nyert, valamint eltérő technikával fixált szövetbiopsziák LINE-1 metilációját. Kíváncsiak voltunk a vastagbéliszövet-mintákból izolált DNS fagyasztva tárolásának a metilációs szintre kifejtett hatására az első mérési eredményekhez képest. Analizáltuk az skDNS-t tartósító ágenseket tartalmazó vérvételi



cső (Roche) alkalmazásának következtében megfigyelhető LINE-1 metilációs eltéréseket K3EDTA vérvételi csövekhez hasonlítva, valamint a vérminták tárolási időtartamának, illetve hőmérsékletének hatását skDNS és buffy coat mintákban. Végezetül elemeztük az életkor előrehaladtával és a nemek szerint esetlegesen módosuló LINE-1 metilációs szinteket.

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

Első lépésként a Pyromark Q24 CpG LINE-1 kit által vizsgált CpG-pozíciók külön vett és átlagolt metilációs értékeit analizáltuk. Nem tumoros minták esetén a CpG 1-es pozíció (CpG 328) szignifikánsan magasabb metilációs szinttel rendelkezett a CpG 2 (CpG 321), a CpG 3 (CpG 318) és az átlagolt metilációs értékekhez képest is. Továbbá a legnagyobb mértékű változás (8,7%) a CpG 1 metilációjában volt detektálható a tumoros vs. nem tumoros minták összehasonlításában. Daganatos biopsziák elemzése során nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a vizsgált CpG-pozíciók metilációs értékei között. A LINE-1 promóter régió CpG-helyei eltérő metilációs státusszal rendelkeznek különböző ráktípusokban (149,256,257), valamint különböző mértékű, szelektív demetilációs nyomás alatt állnak (199). Ezen irodalmi adatok által eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a CpG 1-es pozíció funkcionális szerepet tölthet be a kolorektális tumorok kialakulásában. Tehát érdemes elvégezni a CpG-helyek metilációjának szeparált elemzését, főként egy összehasonlító vizsgálat során. Mindezek mellett azonban PhD-munkám további analíziseiben nem tapasztaltuk a CpG 1 metilációjának szignifikáns eltérését a tanulmányozott faktorok függvényében, ezért csak a három CpG-pozíció átlagolt metilációs értékeire koncentráltunk.

### **6.2.2. Az eltérő mintagyűjtési technikák és a szövetminták fixálására alkalmazott különböző metodikák LINE-1 metilációra gyakorolt hatása**

Különböző mintagyűjtési eljárások elemzésekor műtétilag, illetve endoszkópos vizsgálatok során eltávolított tumoros és nem tumoros biopsziák LINE-1 metilációs értékeit vetettük össze. A műtétek során gyűjtött vastagbél-biopsziák LINE-1 metilációja mérsékelten alacsonyabb tartományban mozgott az endoszkópos mintákhoz képest. Ezen eredményünk összefüggésbe hozható a két mintatípus különböző sejttözetével, azaz a kolonoszkópia során gyűjtött minták arányaiban több epiteliális sejtet tartalmazhatnak,

mint a műtétek során eltávolított biopsziák. A vastagbél hámsejtjei magasabb globális DNS-metilációs szinttel rendelkeznek a mezenchimális és az izomsejtekhez viszonyítva (258). Mivel a CRC mintákban detektált szignifikánsan alacsonyabb globális DNS-metilációt a CRC-NAT biopsziákhoz viszonyítva mindkét mintavételezési módszer esetén megfigyeltük, megállapítható, hogy a két analizált mintavételezési technika nem befolyásolja jelentősen a globális DNS-metilációs eredményeket.

A vastagbél szövet minták fixálására alkalmazott különböző technikák vizsgálata során szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt tapasztaltunk FFPE minták esetén az FF biopsziákhoz képest. Érdekes módon, eredményeinkkel ellentétben az irodalmi adatok szerint az FFPE minták magasabb metilációs szinttel rendelkeztek a párosított FF mintákhoz hasonlóan, ugyanis a formalin által létrehozott keresztkötések megakadályozhatják bizonyos nem metilált citozinok konvertálódását a biszulfitek konverzió során (257,259). Azonban eredményeink magyarázatoként szolgálhat, hogy a nem metilált és a metilált citozinok dezaminálódhatnak a formalinfixálás folyamata alatt (260), amely viszont csökkent DNS-metilációs szinthez vezethet. Továbbá kiemelő, hogy elemzésünkben az FF mintákból izolált DNS esetén a tumoros vs. nem tumoros összehasonlításban megfigyelt szignifikáns globális DNS-metilációcsökkenést nem detektáltuk az ugyanazon biológiai mintákból származó FFPE biopsziák összehasonlításakor. Amellett, hogy az irodalomban megtalálható az FFPE biopsziákban tapasztalt szignifikáns globális DNS-hipometiláció a rákos vs. egészséges minták összehasonlításban (192,261), utóbbi eredményünk felhívja a figyelmet arra, hogy a fixálás folyamata során bekövetkező kémiai módosítások a kísérlet eredményét jelentősen befolyásolhatják.

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

Különböző tárolási kondíciók analízise során vastagbél szöveti és vérmintákat is elemeztünk. Összehasonlító tanulmányok gyakran használnak hosszú távon tárolt mintákat, míg a rutin klinikai vizsgálatok inkább frissen gyűjtött mintákra épülnek. Szövetbiopsziák esetén az izolált DNS hosszú távú tárolásának hatására fókuszáltunk, míg vérminták analízisekor olyan szempontokra fektettünk hangsúlyt, amelyek a LINE-

1 metiláció potenciális klinikai felhasználása során kritikus jelentőséggel rendelkezhetnek.

A hosszú távú tárolás hatásának vizsgálata során a szövetmintákból izolált DNS mellett standard DNS-kontrollok mérését is bevontuk az elemzésbe. A minták tárolását  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végeztük két napon (rövid táv), illetve két éven (hosszú táv) keresztül. Analízisünk során a rövid távú tárolás nem eredményezett változást a LINE-1 metilációban. Irahara és mtsai. ehhez hasonlóan nem tapasztaltak eltéréseket, viszont a párhuzamos minták mérésének fontosságát hangsúlyozzák a precizitás növelésének céljából (162). A DNS-minták két éven át történő tárolása esetén viszont szignifikánsan magasabb LINE-1 metilációt tapasztaltunk a kísérlet alapméréseihez képest. Érdekes módon egy frissen publikált tanulmány szerint vérmintákból izolált DNS  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolása 18 hónapon keresztül a globális DNS-metiláció szignifikáns csökkenését eredményezte LC-MS/MS mérési technika alkalmazásával (262). A biszulfítkonvertált, nem metilált és metilált DNS-standardok analízise nem eredményezett szignifikáns metilációs eltérést a mérések sem rövid távú, sem hosszú távú ismétlése során. Ezen eredmények felvetik, hogy nem feltétlenül csak a minták tárolásának időtartama bírhat különös jelentőséggel, hanem a különböző gyártási időszakból beszerzett biszulfítkonverziós kitek alkalmazása is. A DNS-standardok használata megoldást jelenthet a tárolás során bekövetkező LINE-1 metilációs eltérések detektálására, viszont a teljes mérési folyamat monitorozásának céljából konvertált minták mellett, nem konvertált kontroll DNS-ek alkalmazása is szükséges.

A tárolási kondíciók LINE-1 metilációra kifejtett hatásának tanulmányozása során következő lépésként frissen gyűjtött vérmintákat analizáltunk. Az alkalmazott gyűjtőcső típusának (standard K3EDTA és skDNS-t tartósító Roche), illetve a teljes vér tárolásának és tárolási hőmérsékletének LINE-1 metilációra gyakorolt hatását elemeztük buffy coat, valamint skDNS-mintákban.

Roche csövekbe gyűjtött vérminták esetén szignifikánsan magasabb LINE-1 metilációt találtunk az skDNS-frakcióban a konvencionális K3EDTA vérvételicsövekbe gyűjtött mintákhoz hasonlítva. Továbbá mérsékelt, de szignifikánsan alacsonyabb metilációs értékeket tapasztaltunk buffy coat mintákban a Roche vs. K3EDTA összehasonlítás során. Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányában szintén

tartósítószer tartalmazó vérvételicsövek (Streck) metilációs mintázatra gyakorolt hatását vizsgáltuk skDNS-mintákban, amelyben szintén szignifikáns DNS-metilációs eltéréseket detektáltunk a Streck csövekben a K3EDTA vérvételi csövekhez képest (263). Bulla és mtsai. egy friss publikációval összhangban nem figyeltek meg metilációs változást fehérvérsejtekből izolált DNS-minták esetén a DNS tartósítására szolgáló ágensek alkalmazása során (186,264), azonban eredményeink és korábbi kutatások adatai alapján nem zárható ki ezen ágensek DNS-metilációt befolyásoló hatása (188,189,263).

Eltérő tárolási kondíciók analízisében a különböző vérvételi csövekbe frissen gyűjtött vérmintákat szobahőmérsékleten, valamint 4 °C-on tároltuk 0, 3 és 6 órán keresztül. A DNS-izolálás során párhuzamos buffy coat minták esetén 1, valamint 2 órán keresztül végeztük a sejtek lízisét. A tárolási változók LINE-1 metilációra gyakorolt hatását előző vizsgálatunkhoz hasonlóan buffy coat és skDNS mintákon elemeztük, azonban nem tapasztaltunk szignifikáns metilációs változást sem az skDNS, sem a buffy coatból izolált DNS mintákban. Shiwa és mtsai. eltérő globális DNS-metilációs mintázatot figyeltek meg Illumina Infinium Human Methylation 450 array alkalmazásával buffy coat frakcióban a vér 4 °C-on való 24 órás tárolásának következtében (265). Feltételezésük szerint a detektált különbség az idővel megváltozó sejtösszetételnek tulajdonítható. Egy további tanulmányban is a vérminták mind szobahőmérsékleten, mind 4 °C-on történő több napos tárolását követően szignifikáns DNS-metilációs csökkenést találtak fehérvérsejtekből (266). Továbbá skDNS-mintákban megfigyelt eredményeinkkel ellentétben, az EDTA vérvételi csövekbe gyűjtött vér 72 órás tárolását követően szignifikánsan emelkedett globális DNS-metilációt tapasztaltak RRBS módszer használatával (267). Az irodalmi adatoktól eltérő eredményeink magyarázataként szolgálhat, hogy kutatásunk során rövidebb ideig tároltuk a mintákat a felsorolt tanulmányokban analizált időtartamokhoz képest.

PhD-munkám során kapott eredményeink, illetve azok irodalmi adatokkal történő összevetése alapján fontosnak tartjuk egy összehasonlító vagy klinikai vizsgálat esetén a LINE-1 metilációs méréseket megelőző metodikai faktorok standardizálását, ugyanis a vérvételi csövekben található különböző kémiai ágensek, illetve az esetleges tárolás befolyásolhatja a kapott DNS-metilációs eredményeket.

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

Az életkor és a LINE-1 metilációs szint összevetése során nem figyeltünk meg szignifikáns korrelációt, azonban szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet detektáltunk 40 évnél idősebb női páciensek esetén a 40 évnél fiatalabb női személyekhez viszonyítva. Egy korábbi tanulmány egészséges vastagbéliszövet elemzése során szintén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt talált a minták legidősebb kvartilise esetén a legfiatalabbhoz képest, viszont a teljes mintaszett összevetésekor nem tapasztaltak szignifikáns metilációs eltérést (228).

A nemek LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának analízise során nem detektáltunk metilációs különbséget, ami összhangban áll egy korábbi kutatás vastagbéliszöveten végzett elemzésének eredményeivel (268). El-Maarri és mtsai. azonban szignifikánsan magasabb LINE-1 metilációt írtak le férfiakról gyűjtött vérminták esetén női páciensekhez hasonlítva (269).

Összességében elmondható, hogy a kutatásunk során megfigyelhető, valamint a korábban közölt eredmények alapján az életkor LINE-1 metilációra gyakorolt hatása, illetve a nemek között esetlegesen detektálható metilációs különbségek indokoltá teszik a kutatás során kapott eredmények kor- és nemfüggőségének ellenőrzését.

### **6.3. Legfőbb új megállapítások**

1. A kolorektális ép-adenóma-karcinóma szekvencia mentén tapasztalt globális DNS-hipometiláció mellett szintén szignifikáns DNS-metilációs csökkenést figyeltünk meg a tumoros vs. IBD összehasonlításban is LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás alkalmazásával. Azonban nem detektáltunk eltérést a globális DNS-metilációs mintázatban gyulladásoos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött szöveti biopsziák esetén az ép mintákhoz viszonyítva.

2. Szignifikáns globális DNS-hipometilációt tapasztaltunk LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással vastagbél-tumoros személyek vérplazmájából izolált szabad DNS frakcióban az egészséges személyekhez képest, amelyek közül kiemelendő, hogy adenóma stádiummal rendelkező páciensektől gyűjtött plazmamintákban is sikerült

kimutatnunk szignifikáns LINE-1 hipometilációt. Gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek mintái nem mutattak globális DNS-metilációs változást.

3. Szignifikánsan csökkenő *in situ* folsav- és SAM-szintet detektáltunk a kolorektális ép-adenóma-karcinóma szekvencia mentén immunhisztokémia módszerrel, a folátreceptor  $\beta$  mRNS- és fehérjeexpressziójának, illetve a globális DNS-metiláció szintjének csökkenésével összhangban.

4. A Pyromark Q24 CpG LINE-1 kit által vizsgált CpG-helyek közül a CpG 1-es pozíció (CpG 328) szignifikánsan magasabb metilációs szinttel rendelkezett a CpG 2 (CpG 321), a CpG 3 (CpG 318) és az átlagolt metilációs értékekhez képest nem tumoros vastagbéliszövet, valamint egészséges, vastagbél-tumoros személyektől és gyulladásos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött buffy coat mintákban. Kolorektális adenómás, valamint karcinómás személyek vastagbél-biopsziáiban nem tapasztaltunk jelentős metilációs különbséget a CpG-pozíciók között.

5. Különböző mintavételezési technikák vizsgálata során nem detektáltunk szignifikáns LINE-1 metilációs eltéréseket az endoszkópos és a műtéti minták között. A friss-fagyasztás, valamint formalin általi fixálás összehasonlításakor szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt figyeltünk meg az FFPE mintákban az FF biopsziákhoz képest. Továbbá az FF mintákban tumoros vs. nem tumoros összehasonlítás során mért szignifikáns globális DNS-hipometiláció nem volt detektálható FFPE minták esetén.

6. Vastagbéliszövetből izolált DNS hosszú távú (2 év) tárolása után végzett LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás eredményei szignifikánsan magasabbnak adódtak az első mérési ponthoz hasonlítva, míg a konvertált DNS-standardok vizsgálata nem mutatott LINE-1 metiláció változást. Tehát a hosszú távú tárolás, illetve a különböző gyártási ciklusban beszerzett biszulfidkonverziós kitek alkalmazása torzíthatják a LINE-1 metilációs eredményeket.

7. A sejten kívüli szabad DNS tartósítására szolgáló ágenst tartalmazó vérvételi cső (Roche) alkalmazásakor szignifikánsan magasabb LINE-1 metilációt tapasztaltunk skDNS és szignifikánsan alacsonyabb metilációt detektáltunk buffy coat mintákban a konvencionális K3EDTA vérvételi csövekhez képest.

8. Az életkor globális DNS-metilációs szintre gyakorolt hatásának vizsgálata során szignifikáns LINE hipometilációt figyeltünk meg 40 évnél idősebb nők esetén a 40 évnél fiatalabbakhoz viszonyítva.

## 7. Következtetések

PhD-munkám középpontjában a vastagbél-daganatok kialakulásának egy korai molekuláris eseménye, a globális DNS-hipometiláció jelensége áll, amely többek között a mobilis genetikai elemek reaktivációjához és a kromoszomális instabilitás létrejöttéhez vezethet. Munkánk során célunk volt a genomszintű DNS-metilációs eltérések vizsgálata egészséges személyek, valamint kolorektális adenómás, karcinómás és gyulladással járó bélbetegségben szenvedő betegek vastagbél-szöveti és vérmintáiban LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással. Globális DNS-hipometilációt figyeltünk meg vastagbél-daganatos betegektől nyert szövet- és skDNS-mintákban az ép mintákhoz képest. Az IBD vs. N összehasonlításban nem tapasztaltunk globális DNS-metilációs különbséget. Plazmaminták esetén kiemelő, hogy már rákmegelőző adenóma állapotban is szignifikánsan alacsonyabb globális DNS-metilációs szintet mutattunk ki a nem tumoros mintákhoz hasonlítva. Az AD és CRC esetekre specifikus LINE-1 metilációs határérték meghatározását nehezíti, hogy a globális DNS-hipometiláció több ráktípusra is jellemző, továbbá, hogy a tumoros csoportok LINE-1 metilációs értékei relatív nagy szórással rendelkeznek. Azonban egy lineáris vizsgálat során ugyanazon személytől gyűjtött vérmintákban mért LINE-1 metilációváltozás olyan minimálisan invazív monitorozási módszer alapjaként szolgálhat, amely hozzájárulhat az AD, valamint a CRC kialakulásának, továbbá a CRC progressziójának vagy remissziójának detektálásához.

Ezen analíziseinket követően arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a globális DNS-hipometiláció kialakulásának hátterében milyen molekuláris folyamatok állhatnak. A DNS-metilációhoz köthető gének transzkriptomikai vizsgálatában szignifikáns változást mutató eredményeink főként az 1C ciklus génjeit érintették, amelyek fokozott kifejeződésére az irodalom alapján a folyamatosan osztódó sejtek megnövekedett nukleotidigénye szolgálhat magyarázatul. Ez a jelenség összefüggésben állhat a tumorprogresszió során megfigyelt DNS-hipometilációval, amennyiben a folsavat a daganatos sejtek inkább DNS-szintézisre, mint DNS-metilációra fordítják. Az *MTHFR* gén frekvenciált mutációi és a globális DNS-metilációs változás közötti összefüggés analízisében kapott eredmények egyéb szabályozó mechanizmus jelentőségét vetették fel CRC esetén. Ettől eltérően a heterozigóta AD mintákban tapasztalt hipometiláció összhangban volt az *MTHFR* aktivitáscsökkenésével potenciálisan járó alacsonyabb



SAM-szinttel. A metildonor molekulák *in situ* elérhetőségének elemzése során csökkent folsav- és SAM-mennyiséget figyeltünk meg a vastagbél tumoros mintákban az épekhez képest, ami összefüggésben állhat a detektált *FOLR2* alulexpresszióval. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a folsav és a SAM nem megfelelő szintű mennyisége hozzájárulhat a globális DNS-hipometiláció létrejöttéhez, ezáltal a daganatok kialakulásához.

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

## 8. Összefoglalás

A kolorektális tumorok kialakulása során korai epigenetikai hajtóerő a globális DNS-hipometiláció, amely hozzájárul a kromoszomális instabilitás létrejöttéhez. Ez ösztönzött bennünket az egészséges, kolorektális adenómás és karcinómás, valamint gyulladásos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött vastagbéliszöveti és plazmaminták globális DNS-metilációs mintázatának vizsgálatára, valamint a folyamat háttérében álló lehetséges molekuláris változások elemzésére. Szignifikánsan alacsonyabb DNS-metilációt tapasztaltunk az adenómás, illetve a rákos személyektől gyűjtött szövet- és plazmamintákban az egészséges, valamint a gyulladásos bélbetegségben szenvedő páciensek mintáihoz képest. Ezen eredményeink - különösképpen a már adenóma stádiumban detektált globális DNS-hipometiláció - ígéretesek lehetnek egy a LINE-1 metiláció mérésén alapú módszer fejlesztése esetén, amely vastagbél-daganatos betegek szűréséhez, továbbá klinikai utánkövetéséhez is hozzájárulhat. Emellett a transzkriptomikai, valamint anyagcsereszinten elvégzett elemzéseink alapján feltételezhetjük, hogy a metildonor molekulák - azaz a folsav és a SAM - csökkent mennyisége vastagbél-tumorokban összefüggésben állhat a globális DNS-hipometiláció kialakulásával. A LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás elterjedten alkalmazott globális DNS-metiláció becslési módszer, amely reprodukálhatóságának növelése nagy jelentőséggel bír. Összehasonlító analíziseink eredményei szerint kiemelten fontos a biopsziák azonos módon történő gyűjtése, fixálása, valamint az egyező gyártási időszakban beszerzett reagensek alkalmazása. Vérminták vizsgálatakor kruciális az azonos vérvételi csövek alkalmazása, ugyanis a DNS-tartósító ágensek módosíthatják a DNS-metilációs eredményeket. Továbbá kiemelendő a vérminták ugyanolyan módon történő tárolása, illetve mielőbbi feldolgozása. Végezetül biszulfidkonvertált és nem konvertált DNS-standardok alkalmazása segítheti a LINE-1 piroszekvenálás precizitásának követését. Összességében elmondható, hogy eredményeink olyan ismeretekkel bővítették a globális DNS-hipometilációról szóló tudományos szakirodalmat, amelyek hozzájárulhatnak a vastagbél-tumorok, így a már rákmegelőző adenóma állapotok kialakulásának megértéséhez, valamint a daganatok hatékony szűréséhez és a vastagbélrákos páciensek utánkövetéséhez.

## 9. Summary

The reduction of genome-wide DNA methylation is an early molecular driving force during colorectal cancer development contributing to chromosomal instability. Hence, we aimed to analyze the global DNA methylation pattern in colorectal tissue and plasma samples of healthy subjects, and patients with colorectal adenoma, carcinoma, and inflammatory bowel disease by LINE-1 bisulfite pyrosequencing. Our additional aim was to investigate the possible molecular changes behind this process. Significant genome-wide DNA hypomethylation was found in tissue and plasma samples collected from patients with colorectal adenomas and carcinomas compared to the healthy controls and cases with inflammatory bowel disease. Our results - especially significant global DNA hypomethylation detected in adenoma stages - may serve crucial information for the development of LINE-1 methylation-based method to screen and monitor tumorous patients. Moreover, our multilevel analysis about the background of global DNA hypomethylation development can imply that the reduced availability of folic acid and SAM molecules can contribute to global DNA hypomethylation. LINE-1 bisulfite-pyrosequencing is a widely used method for global DNA methylation estimation. Hence, to improve the reproducibility of this technique is of great importance. According to the results of our comparative studies, it is important to apply the same collection and fixation methods, as well as to use kits obtained during the same production period. In the case of blood samples, the application of the same type of collection tubes is essential as DNA preservation agents can modify DNA-methylation values. Furthermore, it is highlighted to store the blood samples in the same way, and process them as soon as possible after the collection. Finally, the application of bisulfite-converted and unconverted DNA standards is also recommended to monitor the precision of LINE-1 bisulfite-pyrosequencing measurements. In conclusion, our results have expanded the scientific knowledge about global DNA hypomethylation, which contributes to the better understanding of precancerous lesion formation and the development of a tumor-specific screening and monitoring approach based on LINE-1 hypomethylation.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017 Apr;66(4):683–91.
3. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IM, Vogelstein B, Lengauer C. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16226–31.
4. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016 Aug;469(2):125–34.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759–67.
6. Pouligiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, Yuen ST, Harrison DJ, Wyllie AH, Arends MJ. Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol.* 2010 Feb;220(3):338–47.
7. Grady WM, Pritchard CC. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol.* 2014 Jan;42(1):124–39.
8. Who Classification of Tumours Editorial Board. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 1. World Health Organization; 2019. 635 p.
9. Rubio CA. Colorectal adenomas: time for reappraisal. *Pathol Res Pract.* 2002;198(9):615–20.
10. Remo A, Fassan M, Vanoli A, Bonetti LR, Barresi V, Tatangelo F, Gafà R, Giordano G, Pancione M, Grillo F, Mastracci L. Morphology and Molecular Features of Rare

Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers*. 2019 Jul 23;11(7).

11. Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jan;18(1):56–66.
12. Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2020 Feb;578(7796):527–39.
13. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35(3):323–32.
14. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954 Jun;139(6):846–52.
15. Akkoca AN, Yanık S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Sep 15;7(9):2828–35.
16. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113–30.
17. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013 Summer;6(3):120–8.
18. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8681–6.
19. Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining “chromosomal instability.” *Trends Genet*. 2008 Feb;24(2):64–9.
20. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330–7.
21. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020 Jan 13;20:16.

22. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6870–5.
23. 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. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350–6.
24. Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Dev Biol*. 2016 Aug 1;416(1):249–54.
25. Morange M. What history tells us XXXII. The long and tortuous history of epigenetic marks. *J Biosci*. 2013 Sep;38(3):451–4.
26. Sontheimer EJ, Carthew RW. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):9–12.
27. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jul;73(13):2491–509.
28. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1283:1–16.
29. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2718–25.
30. Rana AK, Ankri S. Reviving the RNA World: An Insight into the Appearance of RNA Methyltransferases. *Front Genet*. 2016 Jun 6;7:99.
31. Marinus MG, Casadesus J. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen

- interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 May;33(3):488–503.
32. Blow MJ, Clark TA, Daum CG, Deutschbauer AM, Fomenkov A, Fries R, Froula J, Kang DD, Malmstrom RR, Morgan RD, Posfai J, Singh K, Visel A, Wetmore K, Zhao Z, Rubin EM, Korlach J, Pennacchio LA, Roberts RJ. The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *PLoS Genet.* 2016 Feb;12(2):e1005854.
  33. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4059–70.
  34. Holliday R. DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1990 Jan 30;326(1235):329–38.
  35. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet.* 2018 Aug 9;392(10149):777–86.
  36. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948 Aug;175(1):315–32.
  37. Barlow DP. Gametic imprinting in mammals. *Science.* 1995 Dec 8;270(5242):1610–3.
  38. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science.* 1980 Nov 7;210(4470):604–10.
  39. Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science.* 1981 Jan 23;211(4480):393–6.
  40. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997 Aug;13(8):335–40.
  41. Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Mary G, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C; Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen SE. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8689–94.

42. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJM, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. 2010 Jul 8;466(7303):253–7.
43. Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol*. 2009 Apr;27(4):361–8.
44. Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci*. 2008 May;65(10):1509–22.
45. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Oct;61(19-20):2571–87.
46. Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*. 2009 Oct 1;4(7):487–99.
47. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):61–5.
48. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011 Sep 2;333(6047):1300–3.
49. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930–5.
50. Dominguez PM, Shaknovich R. Epigenetic function of activation-induced cytidine deaminase and its link to lymphomagenesis. *Front Immunol*. 2014 Dec 18;5:642.



51. Mugal CF, Ellegren H. Substitution rate variation at human CpG sites correlates with non-CpG divergence, methylation level and GC content. *Genome Biol.* 2011 Jun 22;12(6):R58.
52. Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. *Mutat Res.* 1993 Jan;285(1):61–7.
53. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* 2011 Sep 2;333(6047):1303–7.
54. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8 Suppl):2333S – 2335S.
55. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52353–60.
56. Zhao Y, Sun H, Wang H. Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell Biosci.* 2016 Jul 11;6(1):45.
57. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006 Feb 16;439(7078):871–4.
58. Velasco G, Hubé F, Rollin J, Neuillet D, Philippe C, Bouzinba-Segard H, Galvani A, Viegas-Péquignot E, Francastel C. Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 18;107(20):9281–6.
59. Merry CR, Forrest ME, Sabers JN, Beard L, Gao XH, Hatzoglou M, Jackson MW, Wang Z, Markowitz SD, Khalil AM. DNMT1-associated long non-coding RNAs

- regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Hum Mol Genet.* 2015 Nov 1;24(21):6240–53.
60. Fu A, Jacobs DI, Zhu Y. Epigenome-wide analysis of piRNAs in gene-specific DNA methylation. *RNA Biol.* 2014;11(10):1301–12.
61. Shapiro (Ed) SK, Fritz Schlenk (Joint Ed), U.S. Argonne National Laboratory, Lemont, Ill. *Transmethylation and Methionine Biosynthesis*, Edited by Stanley K. Shapiro Fritz Schlenk. 1965. 261 p.
62. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017 Jan 10;25(1):27–42.
63. Zsigrai S, Kalmár A, Valcz G, Szigeti KA, Barták BK, Nagy ZB, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. [Physiological and pathophysiological significance of vitamin B. ]. *Orv Hetil.* 2019 Jul;160(28):1087–96.
64. Frigerio B, Bizzoni C, Jansen G, Leamon CP, Peters GJ, Low PS, Matherly LH, Figini M. Folate receptors and transporters: biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 12;38(1):125.
65. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med.* 2009 Jan 28;11:e4.
66. Cai S, Quan S, Yang G, Ye Q, Chen M, Yu H, Wang G, Wang Y, Zeng X, Qiao S. One carbon metabolism and mammalian pregnancy outcomes. *Mol Nutr Food Res.* 2021 Jan;65(2):e2000734.
67. Gordon M, Ravel JM. Formylfolic acid, a functional derivative of folic acid. *J Am Chem Soc.* 1948 Feb;70(2):878.
68. Schiffer CA, Clifton IJ, Davisson VJ, Santi DV, Stroud RM. Crystal structure of human thymidylate synthase: a structural mechanism for guiding substrates into the active site. *Biochemistry.* 1995 Dec 19;34(50):16279–87.

69. Barlowe CK, Appling DR. In vitro evidence for the involvement of mitochondrial folate metabolism in the supply of cytoplasmic one-carbon units. *Biofactors*. 1988 Jul;1(2):171–6.
70. Pareek V, Pedley AM, Benkovic SJ. Human de novo purine biosynthesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2021 Feb;56(1):1–16.
71. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2382S – 2387S.
72. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2003;48(1):1–7.
73. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):111–3.
74. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998 May;62(5):1044–51.
75. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998 Jul;64(3):169–72.
76. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 1991 Mar;48(3):536–45.
77. Marosi K, Agota A, Végh V, Joó JG, Langmár Z, Kriszbacher I, Nagy ZB. The role of homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, methionine synthase reductase polymorphisms in the development of cardiovascular diseases and hypertension. *Orv Hetil*. 2012 Mar 25;153(12):445–53.

78. Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr.* 2000 Jun;83(6):593–6.
79. Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, Bristow S, Bowles M, Fragouli E, Delhanty J, Wells D. Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet.* 2016 May;135(5):555–68.
80. Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):35785–93.
81. Smith AD, Refsum H. Homocysteine - from disease biomarker to disease prevention. *J Intern Med.* 2021 Oct;290(4):826–54.
82. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969 Jul;56(1):111–28.
83. Hasan T, Arora R, Bansal AK, Bhattacharya R, Sharma GS, Singh LR. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp Mol Med.* 2019 Feb 21;51(2):1–13.
84. Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE, Giovannucci EL. The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Mar;11(3):227–34.
85. Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol.* 2001 Jan;11(1):65–72.
86. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun 2;85(11):875–84.
87. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJM, Appleby P, Gout S, Terry C, Emery PW, Sanders TAB. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal

- adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1240–8.
88. Burr NE, Hull MA, Subramanian V. Folic Acid Supplementation May Reduce Colorectal Cancer Risk in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2017 Mar;51(3):247–53.
89. Schernhammer ES, Giovannucci E, Kawasaki T, Rosner B, Fuchs CS, Ogino S. Dietary folate, alcohol and B vitamins in relation to LINE-1 hypomethylation in colon cancer. *Gut*. 2010 Jun;59(6):794–9.
90. Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. *J Nutr*. 2003 Nov;133(11 Suppl 1):3731S – 3739S.
91. Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol*. 2005 Jun;83(3):296–321.
92. MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*. 1995 May 12;270(19):11327–37.
93. Campbell PM, Szyf M. Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway. *Carcinogenesis*. 2003 Jan;24(1):17–24.
94. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10604–9.
95. Shibata D. Inferring human stem cell behaviour from epigenetic drift. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):199–205.
96. Issa JP. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. *J Clin Invest*. 2014 Jan;124(1):24–9.
97. Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science*. 1983 Jun 3;220(4601):1055–7.

98. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, Zhang N, Liang S, Donehower LA, Issa JPJ. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* 2010 Mar;20(3):332–40.
99. Yatabe Y, Tavaré S, Shibata D. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10839–44.
100. Landan G, Cohen NM, Mukamel Z, Bar A, Molchadsky A, Brosh R, Horn-Saban S, Zalcenstein DA, Goldfinger N, Zundelovich A, Gal-Yam EN, Rotter V, Tanay A. Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues. *Nat Genet.* 2012 Nov;44(11):1207–14.
101. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016 Jul;2(7):e1600584.
102. Horvath S. Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2015 May 13;16(1):96.
103. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018 Jun;19(6):371–84.
104. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, Christensen BC, Gladyshev VN, Heijmans BT, Horvath S, Ideker T, Issa JPJ, Kelsey KT, Marioni RE, Reik W, Relton CL, Schalkwyk LC, Teschendorff AE, Wagner W, Zhang K, Rakyan VK. DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol.* 2019 Nov 25;20(1):249.
105. McCartney DL, Stevenson AJ, Walker RM, Gibson J, Morris SW, Campbell A, Murray AD, Whalley HC, Porteous DJ, McIntosh AM, Evans KL, Deary IJ, Marioni RE. Investigating the relationship between DNA methylation age acceleration and risk factors for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* 2018 Jun 21;10:429–37.
106. Perna L, Zhang Y, Mons U, Holleczeck B, Saum KU, Brenner H. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin Epigenetics.* 2016 Jun 3;8(1):64.
107. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3573–

7.

108. Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, Chu FF, Pfeifer GP. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10280–9.
109. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4(2):143–53.
110. Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene.* 2003 Jun 26;22(26):4128–33.
111. Goetz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science.* 1985 Apr 12;228(4696):187–90.
112. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5400–13.
113. Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet.* 2001;35:501–38.
114. Jordà M, Díez-Villanueva A, Mallona I, Martín B, Lois S, Barrera V, Esteller M, Vavouri T, Peinado MA. The epigenetic landscape of Alu repeats delineates the structural and functional genomic architecture of colon cancer cells. *Genome Res.* 2017 Jan;27(1):118–32.
115. Rodić N, Burns KH. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS Genet.* 2013 Mar;9(3):e1003402.
116. Dolci M, Favero C, Tarantini L, Villani S, Bregni M, Signorini L, Della Valle A, Crivelli F, D'Alessandro S, Ferrante P, Bollati V, Delbue S. Human endogenous retroviruses env gene expression and long terminal repeat methylation in colorectal cancer patients. *Med Microbiol Immunol.* 2020 Apr;209(2):189–99.
117. Han K, Lee J, Kim HS, Yang K, Yi JM. DNA methylation of mobile genetic elements

- in human cancers. *Genes Genomics*. 2013 Jun;35(3):265–71.
118. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998 Sep 3;395(6697):89–93.
119. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):489–92.
120. Dubnau J. The Retrotransposon storm and the dangers of a Collyer’s genome. *Curr Opin Genet Dev*. 2018 Apr;49:95–105.
121. Sunami E, de Maat M, Vu A, Turner RR, Hoon DSB. LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS One*. 2011 Apr 14;6(4):e18884.
122. Corley DA, Jensen CD, Marks AR, Zhao WK, Lee JK, Doubeni CA, Zauber AG, de Boer J, Fireman BH, Schottinger JE, Quinn VP, Ghai NR, Levin TR, Quesenberry CP. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1298–306.
123. Ivancevic AM, Kortschak RD, Bertozzi T, Adelson DL. LINEs between Species: Evolutionary Dynamics of LINE-1 Retrotransposons across the Eukaryotic Tree of Life. *Genome Biol Evol*. 2016 Dec 14;8(11):3301–22.
124. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, Kazazian Jr, Haig H. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5280–5.
125. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(6):1973–85.
126. Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, Goel A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2014 Apr;63(4):635–46.



127. Dai L, LaCava J, Taylor MS, Boeke JD. Expression and detection of LINE-1 ORF-encoded proteins. *Mob Genet Elements*. 2014 May 22;4:e29319.
128. Hohjoh H, Singer MF. Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J*. 1996 Feb 1;15(3):630–9.
129. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):905–16.
130. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, Gabriel A. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*. 1991 Dec 20;254(5039):1808–10.
131. Okada N, Hamada M, Ogiwara I, Ohshima K. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene*. 1997 Dec;205(1-2):229–43.
132. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res*. 1992 Feb 1;52(3):643–5.
133. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol*. 2006 Apr 14;357(5):1383–93.
134. Longhese MP, Mantiero D, Clerici M. The cellular response to chromosome breakage. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1099–108.
135. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002 Aug 9;110(3):315–25.
136. Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res*. 2001 Dec;11(12):2059–65.
137. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, Zhang J, Rose DW, Fu XD, Glass CK, Rosenfeld MG. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009 Dec 11;139(6):1069–83.

138. Whitelaw E, Martin DI. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):361–5.
139. Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1;9(4):653–7.
140. St Laurent G 3rd, Hammell N, McCaffrey TA. A LINE-1 component to human aging: do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? *Mech Ageing Dev.* 2010 May;131(5):299–305.
141. Fitch DH, Bailey WJ, Tagle DA, Goodman M, Sieu L, Slightom JL. Duplication of the gamma-globin gene mediated by L1 long interspersed repetitive elements in an early ancestor of simian primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7396–400.
142. Chandra D, Tyagi S, Singh J, Deka R, Manivannan P, Mishra P, Pati HP, Saxena R. Utility of 5-Methylcytosine Immunohistochemical Staining to Assess Global DNA Methylation and Its Prognostic Impact in MDS Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Dec 29;18(12):3307–13.
143. Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods.* 2021 Mar;187:28–43.
144. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology.* 2016 Jan 6;5(1).
145. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry.* 1970 Jul 7;9(14):2858–65.
146. Beck S, Rakyan VK. The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet.* 2008 May;24(5):231–7.
147. Burke DG, Griffiths K, Kassir Z, Emslie K. Accurate measurement of DNA methylation that is traceable to the international system of units. *Anal Chem.* 2009 Sep 1;81(17):7294–301.
148. Poulin M, Zhou JY, Yan L, Shioda T. Pyrosequencing Methylation Analysis.

Methods Mol Biol. 2018;1856:283–96.

149. Phokaew C, Kowudtitham S, Subbalekha K, Shuangshoti S, Mutirangura A. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. *Nucleic Acids Res.* 2008 Oct;36(17):5704–12.
150. Ponomaryova AA, Rykova EY, Gervas PA, Cherdyntseva NV, Mamedov IZ, Azhikina TL. Aberrant Methylation of LINE-1 Transposable Elements: A Search for Cancer Biomarkers. *Cells.* 2020 Sep 2;9(9).
151. Aparicio A, North B, Barske L, Wang X, Bollati V, Weisenberger D, Yoo C, Tannir N, Horne E, Groshen S, Jones Peter, Yang Allen, Issa JP. LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. *Epigenetics.* 2009 Apr 1;4(3):176–84.
152. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Barone G, Mazzoleni P, Catalfo A, De Guidi G, Iemmolo MG, Crimi N, Agodi A. Mediterranean Diet and Particulate Matter Exposure Are Associated With LINE-1 Methylation: Results From a Cross-Sectional Study in Women. *Front Genet.* 2018 Oct 30;9:514.
153. Agodi A, Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Canto C, Marchese AE, Vinciguerra M. Low fruit consumption and folate deficiency are associated with LINE-1 hypomethylation in women of a cancer-free population. *Genes Nutr.* 2015 Sep;10(5):480.
154. Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, Tanaka N, Shima K, Hazra A, Schernhammer ES, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol Cancer.* 2010 May 27;9(1):125.
155. Mima K, Nowak JA, Qian ZR, Cao Y, Song M, Masugi Y, Shi Y, da Silva A, Gu M, Li W, Hamada T, Zhang X, Wu K, Meyerhardt JA, Baba H, Giovannucci EL, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Nishihara R. Tumor LINE-1 methylation level and colorectal cancer location in relation to patient survival. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55098–109.

156. Tajuddin SM, Amaral AFS, Fernández AF, Rodríguez-Rodero S, Rodríguez RM, Moore LE, Tardón A, Carrato A, García-Closas M, Silverman DT, Jackson BP, García-Closas R, Cook AL, Cantor KP, Chanock S, Kogevinas M, Rothman N, Real FX, Fraga MF, Malats N. Genetic and non-genetic predictors of LINE-1 methylation in leukocyte DNA. *Environ Health Perspect.* 2013 Jun;121(6):650–6.
157. Gebrekiristos M, Melson J, Jiang A, Buckingham L. DNA methylation and miRNA expression in colon adenomas compared with matched normal colon mucosa and carcinomas. *Int J Exp Pathol.* 2022 Jun;103(3):74–82.
158. Akimoto N, Zhao M, Ugai T, Zhong R, Lau MC, Fujiyoshi K, Kishikawa J, Haruki K, Arima K, Twombly TS, Zhang X, Giovannucci EL, Wu K, Song M, Chan AT, Cao Y, Meyerhardt JA, Ng K, Giannakis M, Väyrynen JP, Nowak JA, Ogino S. Tumor Long Interspersed Nucleotide Element-1 (LINE-1) Hypomethylation in Relation to Age of Colorectal Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers.* 2021 Apr 22;13(9).
159. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1827–31.
160. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Fend L. *Hematopathology E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2016. 1136 p.
161. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods Mol Biol.* 2015;1343:249–64.
162. Irahara N, Nosho K, Baba Y, Shima K, Lindeman NI, Hazra A, Schernhammer ES, Hunter DJ, Fuchs CS, Ogino S. Precision of pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells. *J Mol Diagn.* 2010 Mar;12(2):177–83.
163. Mattox AK, Bettgowda C, Zhou S, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Applications of liquid biopsies for cancer. *Sci Transl Med.* 2019 Aug 28;11(507).

164. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb;142(3-4):241–3.
165. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019 Apr 16;20(8):1057–67.
166. Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest.* 1990 Jul;86(1):69–74.
167. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta.* 2011 May 12;412(11-12):806–11.
168. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646–50.
169. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318–22.
170. Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, Chapman WC, Washington MK, Willis J, Markowitz SD, Grady WM. CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Aug;45(8):781–9.
171. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest.* 2004 Jul;84(7):884–93.
172. 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. Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics.* 2016 Aug 2;11(8):588–602.

173. 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. DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BMC Cancer*. 2015 Oct 19;15:736.
174. 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. Comprehensive DNA Methylation Analysis Reveals a Common Ten-Gene Methylation Signature in Colorectal Adenomas and Carcinomas. *PLoS One*. 2015 Aug 20;10(8):e0133836.
175. Silva AL, Dawson SN, Arends MJ, Guttula K, Hall N, Cameron EA, Huang THM, Brenton JD, Tavaré S, Bienz M, Ibrahim AEK. Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer*. 2014 Nov 29;14(1):891.
176. Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, Ito Y. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep*. 2007 Nov;18(5):1225–30.
177. 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. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics*. 2017 Sep;12(9):751–63.
178. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*. 2008 Feb;54(2):414–23.
179. Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One*. 2012 Sep 25;7(9):e46000.

- 180.Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2017 Apr;21(2):225–32.
- 181.Barták BK, Márkus E, Kalmár A, Galamb O, Szigeti K, Nagy ZB, Zsigrai S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. [Characteristics and diagnostic applications of circulating cell-free DNA in colorectal cancer]. *Orv Hetil.* 2019 Jul;160(30):1167–77.
- 182.Roperch JP, Incitti R, Forbin S, Bard F, Mansour H, Mesli F, Baumgaertner I, Brunetti F, Sobhani I. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013 Dec 1;13:566.
- 183.Zhang Y, Wu Q, Xu L, Wang H, Liu X, Li S, Hu T, Liu Y, Peng Q, Chen Z, Wu X, Fan JB. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by a novel methylation assay. *Clin Epigenetics.* 2021 Apr 23;13(1):90.
- 184.Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion .* 2001 Feb;41(2):276–82.
- 185.Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar;17(100087):100087.
- 186.Van Paemel R, De Koker A, Caggiano C, Morlion A, Mestdagh P, De Wilde B, Vandesompele J, De Preter K. Genome-wide study of the effect of blood collection tubes on the cell-free DNA methylome. *Epigenetics.* 2021 Jun;16(7):797–807.
- 187.Chen G, Mosier S, Gocke CD, Lin MT, Eshleman JR. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing. *Mol Diagn Ther.* 2014 Oct;18(5):587–93.
- 188.Schröder C, Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *PLoS One.* 2018 Feb 7;13(2):e0192414.

189. Distler J, Tetzner R, Weiss G, König T, Schlegel A, Bagrowski M. Evaluation of Different Blood Collection Tubes and Blood Storage Conditions for the Preservation and Stability of Cell-Free Circulating DNA for the Analysis of the Methylated SEPT9 Colorectal Cancer Screening Marker. *Adv Exp Med Biol.* 2016;924:175–8.
190. Kalmár A, Nagy ZB, Galamb O, Csabai I, Bodor A, Wichmann B, Valcz G, Barták BK, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. Genome-wide expression profiling in colorectal cancer focusing on lncRNAs in the adenoma-carcinoma transition. *BMC Cancer.* 2019 Nov 6;19(1):1059.
191. Valcz G, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Kalmár A, Patai ÁV, Wichmann B, Dede K, Tulassay Z, Molnár B. Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. *Mod Pathol.* 2016 Aug;29(8):928–38.
192. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Voravud Narin, Sriuranpong Virote, Mutirangura Apiwat. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene.* 2004;23(54):8841–6.
193. Shademan M, Zare K, Zahedi M, Mosannen Mozaffari H, Bagheri Hosseini H, Ghaffarzadegan K, Goshayeshi L, Dehghani H. Promoter methylation, transcription, and retrotransposition of LINE-1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Cell Int.* 2020 Sep 1;20:426.
194. Estécio MRH, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AEK, Doshi K, He R, Jelinek J, Yang AS, Yan PS, Huang THM, Tajara EH, Issa JPJ. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One.* 2007 May 2;2(5):e399.
195. Jiang A, Sutherland S, Buckingham L, Melson J. Correlation of LINE-1 hypomethylation with size and dysplasia in colorectal tubular adenomas, and risk for synchronous and metachronous CRC. *J Clin Oncol.* 2020 May 20;38(15\_suppl):e16083–e16083.
196. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis.* 2004



Mar;19(2):95–101.

197. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, Giovannucci EL, Fuchs CS. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Dec 3;100(23):1734–8.
198. Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med.* 2017 Apr 28;49(4):e322.
199. Nüsgen N, Goering W, Dauksa A, Biswas A, Jamil MA, Dimitriou I, Sharma A, Singer H, Fimmers R, Fröhlich H, Oldenburg J, Gulbinas A, Schulz WA, El-Maarri O. Inter-locus as well as intra-locus heterogeneity in LINE-1 promoter methylation in common human cancers suggests selective demethylation pressure at specific CpGs. *Clin Epigenetics.* 2015 Mar 1;7:17.
200. Jiang AC, Buckingham L, Barbanera W, Korang AY, Bishehsari F, Melson J. Erratum to: LINE-1 is preferentially hypomethylated within adenomatous polyps in the presence of synchronous colorectal cancer. *Clin Epigenetics.* 2017 Jul 27;9(1):76.
201. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 1975 Dec;36(6):2251–70.
202. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1775(1):138–62.
203. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 7;14(25):3937–47.
204. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliwer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer.* 2001 Feb 15;91(4):854–62.
205. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet.* 2017 Dec 23;390(10114):2769–78.

206. Glória L, Cravo M, Pinto A, de Sousa LS, Chaves P, Leitão CN, Quina M, Mira FC, Soares J. DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. *Cancer*. 1996 Dec 1;78(11):2300–6.
207. Kupcinskas J, Steponaitiene R, Langner C, Smailyte G, Skieceviciene J, Kupcinskas L, Malfertheiner P, Link A. LINE-1 hypomethylation is not a common event in preneoplastic stages of gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2017 Jul 6;7(1):4828.
208. Nagai Y, Sunami E, Yamamoto Y, Hata K, Okada S, Muro K, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Ishihara S, Hoon DSB Watanabe T. LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Feb 14;8(7):11906–16.
209. Barták BK, Fodor T, Kalmár A, Nagy ZB, Zsigrai S, Szigeti KA, Valcz G, Igaz P, Dank M, Takács I, Molnár B. A Liquid Biopsy-Based Approach for Monitoring Treatment Response in Post-Operative Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 29;23(7).
210. Rai K, Sarkar S, Broadbent TJ, Voas M, Grossmann KF, Nadauld LD, Dehghanizadeh S, Hagos FT, Li Y, Toth RK, Chidester S, Bahr TM, Johnson WE, Sklow B, Burt R, Cairns BR, Jones DA. DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. *Cell*. 2010 Sep 17;142(6):930–42.
211. Lee RM, Hirano K, Anant S, Baunoch D, Davidson NO. An alternatively spliced form of apobec-1 messenger RNA is overexpressed in human colon cancer. *Gastroenterology*. 1998 Nov;115(5):1096–103.
212. Greeve J, Lellek H, Apostel F, Hundoegger K, Barialai A, Kirsten R, Welker S, Greten H. Absence of APOBEC-1 mediated mRNA editing in human carcinomas. *Oncogene*. 1999 Nov 4;18(46):6357–66.
213. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet*. 2013 Sep;45(9):977–83.

214. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 2007 Apr 16;35(9):2955–64.
215. Stenglein MD, Harris RS. APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):16837–41.
216. Du Q, Wang Z, Schramm VL. Human DNMT1 transition state structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 15;113(11):2916–21.
217. Mehrmohamadi M, Liu X, Shestov AA, Locasale JW. Characterization of the usage of the serine metabolic network in human cancer. *Cell Rep.* 2014 Nov 20;9(4):1507–19.
218. Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *J Lab Clin Med.* 1995 Aug;126(2):184–203.
219. Sarabi MM, Naghibalhossaini F. Association of DNA methyltransferases expression with global and gene-specific DNA methylation in colorectal cancer cells. *Cell Biochem Funct.* 2015 Oct;33(7):427–33.
220. Yang J, Deng C, Hemati N, Hanash SM, Richardson BC. Effect of mitogenic stimulation and DNA methylation on human T cell DNA methyltransferase expression and activity. *J Immunol.* 1997 Aug 1;159(3):1303–9.
221. Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis.* 1993 Apr;14(4):551–7.
222. Slack A, Cervoni N, Pinar M, Szyf M. Feedback regulation of DNA methyltransferase gene expression by methylation. *Eur J Biochem.* 1999 Aug;264(1):191–9.
223. Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D,

- Martin SA, Vallette FM, Cartron PF. Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One*. 2010 Jun 29;5(6):e11333.
- 224.Lavoie G, Estève PO, Laulan NB, Pradhan S, St-Pierre Y. PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1. *BMC Biol*. 2011 May 27;9(1):31.
- 225.Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, Yong EL, Xu HE, Melcher K. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):486–9.
- 226.de Boer E, Crane LMA, van Oosten M, van der Vegt B, van der Sluis T, Kooijman P, Low PS, van der Zee AGJ, Arts HJG, van Dam GM, Bart J. Folate Receptor-Beta Has Limited Value for Fluorescent Imaging in Ovarian, Breast and Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015 Aug 6;10(8):e0135012.
- 227.Hanks J, Ayed I, Kukreja N, Rogers C, Harris J, Gheorghiu A, Liu CL, Emery P, Pufulete M. The association between MTHFR 677C>T genotype and folate status and genomic and gene-specific DNA methylation in the colon of individuals without colorectal neoplasia. *Am J Clin Nutr*. 2013 Dec;98(6):1564–74.
- 228.Iacopetta B, Grieu F, Phillips M, Ruszkiewicz A, Moore J, Minamoto T, Kawakami K. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci*. 2007 Sep;98(9):1454–60.
- 229.Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4519–24.
- 230.Hazra A, Fuchs CS, Kawasaki T, Kirkner GJ, Hunter DJ, Ogino S. Germline polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and DNA methylation in colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2010 Mar;21(3):331–45.
- 231.Ferrari A, Torrezan GT, Carraro DM, Aguiar Junior S. Association of folate and vitamins involved in the 1-carbon cycle with polymorphisms in the

- methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and global DNA methylation in patients with colorectal cancer. *Nutrients*. 2019 Jun 18;11(6):1368.
232. Sohn KJ, Jang H, Campan M, Weisenberger DJ, Dickhout J, Wang YC, Cho RC, Yates Z, Lucock M, Chiang EP, Austin RC, Choi SW, Laird PW, Kim YI. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int J Cancer*. 2009 May 1;124(9):1999–2005.
233. Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2007;52(1):73–85.
234. van den Donk M, Buijsse B, van den Berg SW, Ocké MC, Harryvan JL, Nagengast FM, Kok FJ, Kampman E. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jun;14(6):1562–6.
235. Marugame T, Tsuji E, Inoue H, Shinomiya S, Kiyohara C, Onuma K, Hamada H, Koga H, Handa K, Hayabuchi H, Kono S. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal adenomas. *Cancer Lett*. 2000 Apr 14;151(2):181–6.
236. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Jul;9(7):657–63.
237. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Aug;8(8):659–68.
238. Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci*. 2005 Sep;96(9):535–42.

239. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Hunter DJ. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996 Nov 1;56(21):4862–4.
240. McGlynn AP, Wasson GR, O'Reilly SL, McNulty H, Downes CS, Chang CK, Hoey L, Molloy A, Ward M, Strain JJ, McKerr G, Weir DG, Scott JM. Low colonocyte folate is associated with uracil misincorporation and global DNA hypomethylation in human colorectum. *J Nutr.* 2013 Jan;143(1):27–33.
241. Alonso-Aperte E, González MP, Póo-Prieto R, Varela-Moreiras G. Folate status and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in colorectal adenocarcinoma in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2008 Feb;62(2):295–8.
242. Ponnaluri VKC, Estève PO, Ruse CI, Pradhan S. S-adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance. *J Mol Biol.* 2018 Jul 6;430(14):2051–65.
243. Abbasi IHR, Abbasi F, Wang L, Abd El Hack ME, Swelum AA, Hao R, Yao J, Cao Y. Folate promotes S-adenosyl methionine reactions and the microbial methylation cycle and boosts ruminants production and reproduction. *AMB Express.* 2018 Apr 23;8(1):65.
244. Sibani S, Melnyk S, Pogribny IP, Wang W, Hiou-Tim F, Deng L, Trasler J, James SJ, Rozen R. Studies of methionine cycle intermediates (SAM, SAH), DNA methylation and the impact of folate deficiency on tumor numbers in Min mice. *Carcinogenesis.* 2002 Jan;23(1):61–5.
245. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29318–23.
246. Komoto J, Huang Y, Hu Y, Takata Y, Konishi K, Ogawa H, Gomi T, Fujioka M, Takusagawa F. Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of guanidinoacetate methyltransferase from rat liver. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1999 Nov;55(Pt 11):1928–9.

247. Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients*. 2019 Mar 13;11(3).
248. Hübner U, Geisel J, Kirsch SH, Kruse V, Bodis M, Klein C, Herrmann W, Obeid R. Effect of 1 year B and D vitamin supplementation on LINE-1 repetitive element methylation in older subjects. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Mar 1;51(3):649–55.
249. Figueiredo JC, Grau MV, Wallace K, Levine AJ, Shen L, Hamdan R, Chen X, Bresalier RS, McKeown-Eyssen G, Haile RW, Baron JA, Issa JJP. Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Apr;18(4):1041–9.
250. Pufulete M, Al-Ghnam R, Rennie JA, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):838–42.
251. Duthie SJ, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer*. 2000;37(2):245–51.
252. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM, Swendseid ME. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr*. 1998 Jul;128(7):1204–12.
253. 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. 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*. 2022 Apr 3;14(7).
254. 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. S-Adenosylmethionine Treatment of Colorectal Cancer Cell Lines Alters DNA Methylation, DNA Repair and Tumor Progression-Related Gene Expression. *Cells*. 2020 Aug 9;9(8).
255. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Sep 3;9(9):e106290.
256. Sharma A, Jamil MA, Nuesgen N, Dauksa A, Gulbinas A, Schulz WA, Oldenburg J, El-Maarri O. Detailed methylation map of LINE-1 5'-promoter region reveals hypomethylated CpG hotspots associated with tumor tissue specificity. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 May;7(5):e601.
257. Min J, Choi B, Han TS, Lee HJ, Kong SH, Suh YS, Kim TH, Choe HN, Kim WH, Hur K, Yang HK. Methylation Levels of LINE-1 As a Useful Marker for Venous Invasion in Both FFPE and Frozen Tumor Tissues of Gastric Cancer. *Mol Cells*. 2017 May 31;40(5):346–54.
258. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Voravud N, Sriuranpong V, Mutirangura A. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*. 2004 Nov 18;23(54):8841–6.
259. Wen X, Jeong S, Kim Y, Bae JM, Cho NY, Kim JH, Kang, Gyeong H. Improved results of LINE-1 methylation analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with the application of a heating step during the DNA extraction process. *Clin Epigenetics*. 2017 Jan 13;9:1.
260. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):64–71.
261. Boughanem H, Hernandez-Alonso P, Tinahones A, Babio N, Salas-Salvadó J, Tinahones FJ, Macias-Gonzalez M. Association between Serum Vitamin B12 and Global DNA Methylation in Colorectal Cancer Patients. *Nutrients*. 2020 Nov 20;12(11).



262. Gosselt HR, Griffioen PH, van Zelst BD, Oosterom N, de Jonge R, Heil SG. Global DNA (hydroxy)methylation is stable over time under several storage conditions and temperatures. *Epigenetics*. 2021 Jan;16(1):45–53.
263. Barták BK, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. Blood Collection and Cell-Free DNA Isolation Methods Influence the Sensitivity of Liquid Biopsy Analysis for Colorectal Cancer Detection. *Pathol Oncol Res*. 2019 Jul;25(3):915–23.
264. Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, Betsou F, Lescuyer P. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreserv Biobank*. 2016 Feb;14(1):29–38.
265. Shiwa Y, Hachiya T, Furukawa R, Ohmomo H, Ono K, Kudo H, Hata J, Hozawa A, Iwasaki M, Matsuda K, Minegishi N, Satoh M, Tanno K, Yamaji T, Wakai K, Hitomi J, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka H, Tsugane S, Yamamoto M, Sobue K, Shimizu A. Adjustment of cell-type composition minimizes systematic bias in blood DNA methylation profiles derived by DNA collection protocols. *PLoS One*. 2016 Jan 22;11(1):e0147519.
266. Huang LH, Lin PH, Tsai KW, Wang LJ, Huang YH, Kuo HC, Li SC. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*. 2017 Sep 19;12(9):e0184692.
267. Van Paemel R, De Koker A, Caggiano C, Morlion A, Mestdagh P, De Wilde B, Vandesomepele J, De Preter K. Genome-wide study of the effect of blood collection tubes on the cell-free DNA methylome. *Epigenetics*. 2021 Jun;16(7):797–807.
268. Kaz AM, Wong CJ, Dzieciatkowski S, Luo Y, Schoen RE, Grady WM. Patterns of DNA methylation in the normal colon vary by anatomical location, gender, and age. *Epigenetics*. 2014 Apr;9(4):492–502.
269. El-Maarri O, Walier M, Behne F, van Üüm J, Singer H, Diaz-Lacava A, Nüsgen N, Niemann B, Watzka M, Reinsberg J, van der Ven H, Wienker T, Stoffel-Wagner B, Schwaab R, Oldenburg J. Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. *PLoS One*. 2011 Jan

19;6(1):e16252.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### 11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

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

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

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

### 11.2. Nem az értekezés témájában megjelent közlemények

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

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

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

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

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

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

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

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

160(28):1087-1096. doi: 10.1556/650.2019.31441. **IF: 0,497**

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

## 12. Köszönetnyilvánítás

Értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik szakmai és személyes támogatásukkal segítettek PhD-munkám elkészítését:

- programvezetőimnek, Tulassay Zsolt professzor úrnak és Molnár Béla professzor úrnak, továbbá a kutatólaboratóriumunknak helyet adó Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, valamint Belgyógyászati és Onkológiai Klinika igazgatóinak, Igaz Péter professzor úrnak és Takács István professzor úrnak, hogy lehetővé tették doktori munkám megvalósulását;
- témavezetőmnek, Molnár Béla professzor úrnak, akinek irányítása alatt korszerűen felszerelt laboratóriumban végezhettem a PhD-munkámat, továbbá mindig megteremtette a lehetőséget arra, hogy hazai és nemzetközi konferenciákon egyaránt bemutathassam eredményeimet. PhD éveim alatt megtanított a kutatói hivatás alapjaira és segítségével elindulhattam a tudományos pályámon;
- Dr. Galamb Orsolyának, aki mentorom volt, amikor a Tudományos Diákkör keretében megkezdtem tudományos munkámat a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratóriumban. Szakmai hozzáértése, precizitása, motiváltsága inspirálóan hatott rám;
- a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium kutatóinak, Dr. Kalmár-Söpkéz Alexandrának, Dr. Molnár Barbarának, Dr. Nagy Zsófiának, Dr. Valcz Gábornak, Dr. Zsigrai Sárának, Felletár Ildikónak, Dr. Szabó Vanesszának, Dr. Kothalawala Williamnek, Dr. Patai V Árpádnak, akik által számos metodikát, illetve a cikkírás rejtelseit elsajátíthattam. Végtelen türelmükkel segítettek a kísérletek kivitelezése során, szakmai tanácsaik mellett baráti jelenlétükkel is kitartóan támogattak;
- Dr. Wichmann Barnabásnak, Dr. Papp Mártonnak, Dr. Szabó Gittának, akik a statisztika útvesztőiben energiát nem kímélve segítettek eligazodni;
- a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium korábbi tagjainak, Szigeti Anikó

- és Kovács Hajnalka asszisztenseknek a mintagyűjtésben nyújtott segítségükért;
- Berczik Máriának az adminisztratív feladatok megoldásában nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
  - a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet kutatóinak, Dr. Micsik Tamásnak és Dr. Krenács Tibornak az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségükért;
  - Dr. Dohán Orsolya, házi bírálómnak, a PhD-dolgozatom alapos áttekintéséért;
  - végül, de nem utolsó sorban szüleimnek, nővéremnek, nagybátyámnak, unokatestvéreimnek és keresztszüleimnek, akik doktorandusz éveim alatt végig biztos háttérrel nyújtottak, és akik barátaimmal együtt végig türelmesen támogattak a PhD-képzés során.

### 13. Függelék

**F1/A. Táblázat** Kutatásunkba bevont egészséges páciensektől gyűjtött szövetminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , N: egészséges, HE: heterozigóta, MTHFR: 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, WT: vad típus.

Változók		N szövet								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Kor	$\leq 65$	38	80,0	3,1	76,8	2,1	75,8	2,2	77,5	1,7
	$>65$	7	80,2	2,4	76,9	2,8	75,1	2,9	77,4	1,7
Nem	nő	30	80,1	2,9	76,4*	2,0	77,2	2,5	77,2	1,6
	férfi	15	79,9	3,2	77,8	2,3	76,4	1,8	78,0	1,7
MTHFR C677T	WT	11	79,5	3,4	75,3	1,5	74,7	2,8	76,5	1,7
	HE	12	78,7	3,3	76,1	2,3	76,5	2,1	76,9	1,7
MTHFR A1298C	WT	16	79,7	3,9	76,2	2,4	75,9	2,4	77,1	1,9
	HE	7	78,4	1,5	75,7	1,3	75,1	3,3	76,4	1,5

**F1/B. Táblázat** Kutatásunkba bevont egészséges páciensektől gyűjtött buffy coat minták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. N: egészséges.

Változók		N buffy coat								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Kor	$\leq 65$	14	84,7	2,8	77,2	1,9	75,8	2,0	79,2	1,7
	$>65$	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Nem	nő	14	84,6	2,8	77,3	1,9	75,9	2,0	79,3	1,7
	férfi	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F1/C. Táblázat** Kutatásunkba bevont egészséges páciensektől gyűjtött plazmaminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. N: egészséges.

Változók		N plazma								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							



			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	≤65	10	85,8	4,0	80,6	1,8	79,6	3,0	82,0	2,0
	>65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nem</b>	nő	5	84,4	3,8	80,4	2,5	78,7	2,7	81,1	1,9
	férfi	5	87,2	4,1	80,8	0,7	80,6	3,3	82,9	1,8

**F2/A. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbél-adenomás páciensektől gyűjtött szövetminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , AD: kolorektális adenóma, FF: friss-fagyasztott, FFPE: formalinfixált, paraffinba ágyazott, HE: heterozigóta, MTHFR: 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, TA: tubuláris, TVA: tubulovillózus, WT: vad típus.

Változók		AD szövet									
		FF									FFPE
		n	Metilációs szint ± SD (%)								n
CpG 1	SD		CpG 2	SD	CpG 3	SD	Átl.	SD			
<b>Kor</b>	≤65	15	73,9	7,2	73,1	3,5	72,1	3,6	73,0	4,4	13
	>65	22	72,3	7,4	72,5	3,0	72,4	4,6	72,4	4,5	7
<b>Nem</b>	nő	15	70,3	6,6	71,0*	2,8	70,0*	4,0	70,4*	4,2	11
	férfi	22	74,8	7,2	73,9	2,9	73,8	3,6	74,2	4,0	9
<b>Szövettani típusok</b>	TA	25	74,9*	6,4	73,3	3,4	73,0	4,0	73,7*	4,1	8
	TVA	9	67,9	7,9	71,5	2,6	70,1	4,1	70,7	3,9	11
	mindkettő	3	71,9	6,7	72,0	2,7	72,7	5,7	69,8	6,2	-
	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Méret</b>	<10 mm	16	77,6*	4,6	73,8*	3,0	73,7*	3,0	75,0**	3,1	8
	≥10 mm	7	65,9	6,8	69,9	1,8	68,0	3,3	67,9	3,7	1
	mindkettő	11	71,6	6,6	73,6	3,5	73,3	4,7	72,8	4,4	4
	N/A	3	69,6	7,9	71,0	0,1	70,9	3,2	70,4	3,6	7
<b>Szám</b>	1	9	71,1	7,2	70,8*	1,9	70,7	3,5	70,9	4,0	3
	≥2	26	73,7	7,3	73,6	3,4	72,8	4,4	73,4	4,6	16
	N/A	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>MTHFR C677T</b>	WT	16	74,8	6,0	73,7	3,5	73,1	3,9	73,9*	4,1	-
	HE	12	70,4	7,9	71,5	2,4	70,5	4,3	70,9	4,4	-
<b>MTHFR A1298C</b>	WT	17	75,2	6,7	74,1*	3,3	73,9*	3,4	74,4*	4,0	-
	HE	10	70,2	7,8	71,2	2,8	69,5	4,5	70,3	4,6	-

AD-NAT szövet											
Kor	≤65	8	77,5*	2,7	75,3	1,8	73,7	1,6	75,4	1,2	13
	>65	15	80,9	3,7	74,7	2,4	73,4	2,7	76,3	2,4	7
Nem	nő	12	80,9	2,9	74,9	2,4	73,4	2,8	76,3	2,2	11
	férfi	11	78,4	4,2	74,9	2,1	73,6	1,8	75,6	2,1	9
Szövettani típusok	TA	16	79,4	3,8	75,0	2,2	73,2	2,2	75,8	2,0	8
	TVA	5	80,6	3,5	74,7	0,9	74,5	2,6	76,7	1,8	11
	mindkettő	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Méret	<10 mm	14	79,3	4,3	74,3	2,0	73,0	2,1	75,5	2,2	8
	≥10 mm	4	81,2	2,0	74,4	0,8	74,9	3,1	76,9	1,7	1
	mindkettő	5	79,6	3,0	76,9	2,4	73,8	2,5	76,6	2,1	4
	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Szám	1	5	79,8	2,7	74,0	1,3	73,1	3,5	75,7	2,1	3
	≥2	18	79,7	4,0	75,1	2,3	73,6	2,0	76,1	2,2	16
	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F2/B. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbél-adenómás páciensektől gyűjtött buffy coat minták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , AD: kolorektális adenóma. TA: tubuláris, TVA: tubulovillózus

Változók		AD buffy coat								
		n	Metilációs szint ± SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Kor	≤65	4	80,9*	1,1	75,4	0,7	75,7	1,4	77,3	0,7
	>65	6	84,4	3,0	75,8	1,5	75,2	3,1	78,5	1,7
Nem	nő	6	82,7	2,5	75,0	0,5	74,7	1,9	77,5	0,8
	férfi	4	83,5	3,9	76,5	1,5	76,5	3,1	78,8	2,0
Szövettani típusok	TA	7	83,6	3,0	75,2	0,5	74,6	1,7	77,9	0,9
	TVA	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	mindkettő	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Méret	<10 mm	6	84,5	2,9	75,7	1,5	75,0	3,1	78,4	1,7
	≥10 mm	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	mindkettő	3	80,9	1,3	75,7	0,6	76,6	0,6	77,8	0,4
Szám	1	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	≥2	8	83,4	3,2	75,8	1,2	75,6	2,8	78,3	1,5

#Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F2/C. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbél-adenómás páciensektől gyűjtött plazmaminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , AD: kolorektális adenóma.

Változók		AD plazma								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Kor	$\leq 65$	6	83,0	4,1	78,6	1,5	78,1	1,4	79,7	1,2
	$> 65$	8	83,7	3,9	78,9	3,0	76,4	1,9	80,1	2,1
Nem	nő	10	82,8	3,1	77,8*	2,0	77,1	2,1	79,4*	1,4
	férfi	4	84,9	5,5	81,1	1,5	77,1	1,0	81,5	1,8
Szövettani típusok	TA	6	82,7	3,7	79,8	2,4	76,2	1,6	80,0	1,4
	TVA	6	83,4	3,9	78,1	2,4	77,7	2,1	79,7	2,2
	mindkettő	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Méret	$< 10$ mm	3	79,7*	1,6	79,3	2,4	77,5	3,1	78,9	0,9
	$\geq 10$ mm	5	86,0	2,7	78,3	3,0	76,5	1,9	80,5	2,4
	mindkettő	6	83,1	4,0	78,9	2,2	77,4	1,1	80,1	1,4
Szám	1,0	6	84,6	4,1	78,9	3,1	76,1	2,0	80,1	2,4
	$\geq 2$	8	82,7	3,8	78,9	2,0	77,7	1,3	80,0	1,3
	N/A	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

#Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F3/A. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbélrákban szenvedő páciensektől gyűjtött endoszkópos szövetminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , CRC: kolorektális karcinóma, FF: friss-fagyasztott, FFPE: formalinfixált, paraffinba ágyazott, HE: heterozigóta, MTHFR: 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz, WT: vad típus.

Változók		CRC szövet								
		FF								FFPE
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
CpG 1	SD		CpG 2	SD	CpG 3	SD	Átl.	SD		

<b>Kor</b>	<b>≤65</b>	10	70,4	8,9	72,3	2,9	70,3	4,1	71,0*	4,9	10
	<b>&gt;65</b>	28	67,9	12,0	70,4	6,6	68,0	8,1	69,1	8,4	10
<b>Nem</b>	<b>nő</b>	13	70,5	11,8	71,3	6,8	69,7	7,4	70,5	8,3	10
	<b>férfi</b>	25	67,6	10,9	70,8	5,4	68,1	7,2	69,2	7,4	10
<b>Stádium (Astler- Coller által módosított Dukes)</b>	<b>korai (A+B)</b>	13	67,1	15,3	68,6	8,1	65,6	9,2	71,8	5,1	9
	<b>késői (C+D)</b>	23	70,1	8,3	72,3	3,8	70,4	5,5	68,1	8,5	8
	<b>N/A</b>	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Lokalizáció</b>	<b>kolon</b>	26	67,2	11,1	70,6	5,8	68,3	7,9	69,1	7,8	10
	<b>rektum</b>	12	71,4	11,3	71,6	6,2	69,5	5,9	70,8	7,4	10
<b>Nyirok- csomó-áttét</b>	<b>0</b>	13	69,6	14,0	69,4	8,2	67,2	9,2	72,0	4,9	9
	<b>≥1</b>	14	70,6	8,3	72,6	4,2	70,3	6,3	66,8	9,6	6
	<b>N/A</b>	11	64,8	10,4	70,8	3,7	68,5	5,5	70,4	6,7	5
<b>Távoli áttét</b>	<b>0</b>	16	70,1	12,7	70,0	7,5	67,7	8,4	69,2	9,3	16
	<b>távoli</b>	14	69,5	10,0	72,3	4,2	69,2	5,9	70,9	6,0	4
	<b>N/A</b>	8	63,4	10,2	71,0	4,7	69,9	7,8	67,5	6,8	-
<b>MTHFR C677T</b>	<b>WT</b>	20	68,7	12,7	69,9	7,1	67,4	8,7	68,7	9,1	-
	<b>HE</b>	14	71,7	7,5	73,4	2,3	71,4	4,4	72,1	4,3	-
<b>MTHFR A1298C</b>	<b>WT</b>	11	69,2	11,7	70,1	6,8	67,9	10,0	69,1	9,0	-
	<b>HE</b>	19	70,0	10,4	71,6	5,1	68,9	5,8	70,2	6,7	-
<b>CRC-NAT szövet</b>											
<b>Kor</b>	<b>≤65</b>	8	79,3	3,8	74,3*	2,7	73,9*	3,1	75,8	2,4	10
	<b>&gt;65</b>	17	79,2	3,7	75,3	1,7	75,0	2,4	76,4	1,8	10
<b>Nem</b>	<b>nő</b>	8	79,1	4,8	75,0	2,5	74,2	2,1	76,1	1,9	10
	<b>férfi</b>	17	79,3	3,1	75,0	2,0	74,9	2,9	76,2	2,1	10
<b>Stádium (Astler- Coller által módosított Dukes)</b>	<b>korai (A+B)</b>	9	78,0	4,0	74,8	2,3	74,7	2,7	75,8	1,9	9
	<b>késői (C+D)</b>	15	79,6	3,2	75,0	2,1	74,4	2,6	76,1	1,7	8
	<b>N/A</b>	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Lokalizáció</b>	<b>kolon</b>	16	79,4	4,0	75,1	2,3	74,3	3,0	76,1	2,2	10
	<b>rektum</b>	9	78,9	3,2	74,8	1,8	75,2	1,8	76,3	1,7	10
<b>Nyirok- csomó-áttét</b>	<b>0</b>	8	78,4	4,1	75,1	2,2	74,8	2,9	76,1	1,8	9
	<b>≥1</b>	14	79,7	3,3	75,0	2,2	74,4	2,7	76,2	1,8	6
	<b>N/A</b>	3	79,3	5,2	74,6	2,3	74,6	2,3	76,8	3,7	5
<b>Távoli áttét</b>	<b>0</b>	11	78,4	3,5	74,4	2,3	74,3	2,7	75,7	1,8	16
	<b>Távoli</b>	10	80,0	3,5	75,7	1,8	74,7	2,8	76,4	1,7	4
	<b>N/A</b>	4	79,3	5,2	74,6	2,3	75,5	2,5	77,1	3,1	-

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F3/B. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbélrákban szenvedő páciensektől gyűjtött műtéti szövetszövetminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , CRC: kolorektális karcinóma.

Változók		CRC szövet								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Kor	$\leq 65$	5	67,7	11,9	69,6	5,4	69,2	5,4	68,8	7,1
	$>65$	16	65,9	10,6	69,0	5,4	67,5	7,8	67,5	7,5
Nem	nő	7	60,7	8,7	66,3	6,1	65,2	8,1	64,1	7,2
	férfi	14	69,1	10,7	70,6	4,3	69,3	6,6	69,7	6,8
Stádium (Astler-Coller által módosított Dukes)	korai (A+B)	10	63,9	9,2	68,3	6,6	67,4	8,5	66,5	7,8
	késői (C+D)	11	68,5	11,8	69,9	3,8	68,4	6,2	69,0	7,0
Lokalizáció	kolon	15	67,5	10,9	70,3	3,8	69,7	6,0	69,2	6,5
	rektum	6	63,3	10,4	66,1	7,3	63,6	8,8	64,3	8,6
Nyirokcsomó -áttét	0	10	63,9	9,2	68,3	6,6	67,4	8,5	66,5	7,8
	$\geq 1$	11	68,5	11,8	69,9	3,8	68,4	6,2	69,0	7,0
	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Távoli áttét	0	16	68,4	10,4	69,9	5,8	69,4	7,5	69,2	7,5
	Távoli	4	63,6	12,1	68,3	3,2	67,0	4,7	66,3	6,6
	N/A	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CRC-NAT szövet</b>										
Kor	$\leq 65$	4	75,5*	4,7	74,4	2,2	72,8	2,8	74,2	2,8
	$>65$	16	78,5	4,5	73,6	2,0	73,2	2,6	75,1	2,7
Nem	nő	7	75,3*	3,3	73,0	1,2	72,6	2,5	73,6	2,2
	férfi	13	79,3	4,7	74,2	2,3	73,4	2,7	75,6	2,7
Stádium (Astler-Coller által módosított Dukes)	korai (A+B)	9	76,3	3,0	73,5	1,8	72,3	2,0	74,0	1,8
	késői (C+D)	11	79,2	5,4	74,1	2,2	73,8	2,9	75,7	3,1
Lokalizáció	kolon	14	76,7	3,2	73,6	1,6	72,5	2,0	74,3	1,8
	rektum	6	80,5	6,5	74,2	2,9	74,7	3,4	76,5	3,8
Nyirokcsomó -áttét	0	9	76,3	3,0	73,5	1,8	72,3	2,0	74,0	1,8
	$\geq 1$	11	79,2	5,4	74,1	2,2	73,8	2,9	75,7	3,1
Távoli áttét	0	14	77,5	4,5	73,9	2,2	72,8	2,7	74,7	2,8
	Távoli	4	79,1	4,1	74,5	0,3	74,3	0,7	76,0	1,4
	N/A	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

#Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F3/C. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbélrákban szenvedő páciensektől gyűjtött buffy coat minták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , CRC: kolorektális karcinóma.

Változók		CRC buffy coat								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	$\leq 65$	4	85,0	2,3	76,1	1,2	74,2*	0,8	78,4	1,1
	$> 65$	6	85,5	2,3	76,7	1,2	76,7	1,5	79,7	1,3
<b>Nem</b>	nő	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	férfi	8	85,1	2,3	76,4	1,0	75,5	1,6	79,0	1,1
<b>Stádium (Astler-Coller által módosított Dukes)</b>	korai (A+B)	3	84,9	2,5	76,9	1,7	77,4*	1,7	79,7	1,6
	késői (C+D)	7	85,5	2,2	76,2	1,0	75,0	1,3	75,0	1,3
<b>Lokalizáció</b>	kolon	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	rektum	6	85,3	2,3	76,5	1,3	76,2	1,9	79,3	1,5
<b>Nyirokcsomó-áttét</b>	0	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	$\geq 1$	3	84,5	1,5	76,1	0,7	74,4	0,8	78,4	1,0
	N/A	5	85,9	2,4	76,1	1,3	75,5	1,3	79,2	1,2
<b>Távoli áttét</b>	0	4	84,4	2,2	76,8	1,4	76,2	2,6	79,1	1,8
	Távoli	5	86,2	2,2	76,5	1,1	75,4	1,3	79,4	1,1
	N/A	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

#Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F3/D. Táblázat** Kutatásunkba bevont vastagbélrákban szenvedő páciensektől gyűjtött plazmaminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. CRC: kolorektális karcinóma.

Változók		CRC plazma								
		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	$\leq 65$	5	85,1	3,6	78,3	1,5	76,5	1,6	80,0	1,8
	$> 65$	8	85,8	3,0	77,7	1,6	76,9	1,2	79,8	0,9
<b>Nem</b>	nő	7	86,2	3,6	77,7	1,8	76,4	1,2	79,7	1,4

	<b>férfi</b>	6	84,7	2,6	78,2	1,3	77,2	1,3	80,0	1,1
<b>Stádium (Astler-Coller által módosított Dukes)</b>	<b>korai (A+B)</b>	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>késői (C+D)</b>	11	85,2	2,9	77,6	1,5	76,8	1,4	79,9	1,4
<b>Lokáció</b>	<b>kolon</b>	9	85,5	3,0	77,8	1,5	77,1	1,2	79,8	0,8
	<b>rektum</b>	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>N/A</b>	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nyirokcsomó -áttét</b>	<b>0</b>	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>≥1</b>	9	85,7	3,3	77,7	1,6	76,6	1,5	79,6	1,2
	<b>N/A</b>	3	85,7	3,7	78,3	1,6	77,5	0,4	80,5	1,7
<b>Távoli áttét</b>	<b>0</b>	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Távoli</b>	6	84,1	2,8	76,9	1,3	76,4	1,7	79,1	1,3
	<b>N/A</b>	6	87,3	2,9	78,7	2,9	77,1	0,8	80,6	0,9

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F4/A. Táblázat** Kutatásunkba bevont gyulladásoos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött szövetminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. IBD: gyulladásoos bélbetegség.

Változók		IBD szövet								
		n	Metilációs szint ± SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	≤65	14	79,8	2,1	75,8	2,4	75,6	2,9	77,1	2,0
	>65	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nem</b>	nő	7	78,6	2,2	75,0	2,5	75,3	2,9	76,3	2,0
	férfi	8	80,6	1,5	76,7	2,1	76,0	2,8	77,8	1,6
<b>IBD típusa</b>	colitis ulcerosa	12	80,0	2,1	77,0	1,1	76,8	1,7	77,9	0,9
	Crohn- betegség	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N/A	3	78,5	1,4	71,7	0,6	71,2	0,7	73,8	0,7

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F4/B. Táblázat** Kutatásunkba bevont gyulladásoos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött buffy coat minták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. IBD: gyulladásoos bélbetegség.

Változók	IBD buffy coat
----------	----------------

		n	Metilációs szint ± SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	≤65	3	83,1	4,0	79,3	1,6	78,9	3,3	80,4	2,4
	>65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nem</b>	nő	3	84,1	5,1	78,6	1,1	78,0	4,0	80,2	3,4
	férfi	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IBD típusa</b>	UC	1 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crohn-betegség	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N/A	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F4/C. Táblázat** Kutatásunkba bevont gyulladásoos bélbetegségben szenvedő páciensektől gyűjtött plazmaminták átlag LINE-1 metilációs értékeinek összefoglalása klinikopatológiai és demográfiai jellemzők alapján. IBD: gyulladásoos bélbetegség.

Változók		n	IBD plazma							
			Metilációs szint ± SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Kor</b>	≤65	11	86,7	2,9	79,8	1,1	76,7	1,8	81,1	0,8
	>65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nem</b>	nő	5	85,6	4,1	80,2	0,9	76,6	1,4	80,8	0,8
	férfi	6	87,6	1,3	79,4	1,3	76,7	2,2	81,2	0,8
<b>IBD típusa</b>	colitis ulcerosa	5	85,2	3,8	79,8	1,4	77,9	1,8	81,0	0,9
	Crohn-betegség	4	87,8	1,5	79,6	1,3	75,9	1,1	81,1	0,9
	N/A	2 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>#</sup>Csak abban az esetben számoltunk metilációs átlagot, ha a vizsgált csoport legalább három mintával rendelkezett.

**F5. Táblázat** Mintavételezési technikák LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata.

Változók		n	Metilációs szint ± SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
<b>Nem tumoros</b>	endoszkópos	24	79,0	3,5	74,9	2,1	74,5	2,6	76,0	1,8
	műtéti	21	78,0	4,5	73,7	2,0	73,2	2,5	75,0	2,6
<b>Tumoros</b>	endoszkópos	36	68,8	11,0	70,8	6,0	68,7	7,2	69,4	7,7
	műtéti	21	66,3	10,7	69,1	5,2	68,0	7,2	67,8	7,3



**F6. Táblázat** Szövetfixálás LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata. FF: friss-fagyasztott minták, FFPE: formalinfixált, paraffinba ágyazott minták. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ .

Változók		n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
			CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Nem tumoros	FF	9	81,2	2,7	77,0	1,0	74,6	2,3	77,6*	0,9
	FFPE	9	76,2	5,1	72,5	4,2	73,8	5,1	74,2	4,3
Tumoros	FF	16	75,7	6,0	75,4	1,4	74,5	3,4	75,2*	3,1
	FFPE	16	74,5	6,7	71,6	5,0	72,1	5,5	72,7	5,2

**F7. Táblázat** Tárolás LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata vastagbéliszöveti biopsziákból izolált DNS-mintákban.  $t_1$ : első mérés,  $t_r$ : ismétlő mérés rövid távú tárolás esetén,  $t_h$ : ismétlő mérés hosszú távú tárolás esetén. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ .

Változók			n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
				CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
Rövid távú tárolás	nem tumoros	$t_1$	14	77,8	4,7	75,8	3,2	76,2	3,2	76,6	2,9
		$t_r$	14	79,9	5,2	75,2	4,2	76,2	3,7	77,1	3,4
	tumoros	$t_1$	12	72,8	7,5	73,1	3,6	72,1	4,1	72,6	4,6
		$t_r$	13	72,2	8,3	71,7	6,7	73,0	7,9	72,3	7
Hosszú távú tárolás	nem tumoros	$t_1$	23	77,2	3,2	72,9	2,6	71,8	3,6	74,0	2,8
		$t_h$	23	78,5	3,6	72,9	2,6	75,0	3	76,3*	2,3
	tumoros	$t_1$	25	70,8	9,4	71,1	4,1	69,6	6,3	70,5	6,4
		$t_h$	25	72,1	8,4	72,7	3,1	71,8	5,4	72,2*	5,3

**F8. Táblázat** Vérminták különböző tárolási kondícióinak LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata buffy coat mintákban. RT: szobahőmérséklet, 3h: buffy coat- és plazmaszeparálás 3 óra tárolás után, 6h: buffy coat- és plazmaszeparálás 6 óra tárolás után, 1h ProtK: 1 óra ProtK emésztés, 2h ProtK: 2 óra ProtK emésztés.

Változók			n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
				CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag	SD
K3EDTA	0h	RT	4	84,1	3,9	73,2	1,9	74,3	3	77,2	2
		3h	RT	4	85,7	4,8	73,9	1,1	74,0	2,9	77,8
	4°C		4	83,3	1,3	73,5	1,1	77,2	1,2	78	0,5
	6h	RT	4	84,9	3,2	73,5	0,7	73,5	1,4	77,3	0,6
		4°C	4	85,0	3,2	73,2	0,8	74,4	2,1	77,5	1,1
	Roche	0h	1h ProtK	4	82,2	5,8	74,6	2,5	76,5	3,4	77,1
2h ProtK			4	83,6	3,8	72,7	1,3	72,6	3,2	76,3	0,6

	<b>3h</b>	<b>1h ProtK</b>	4	83,6	5,3	73,6	0,2	74,2	1,3	77,3	1,2
		<b>2h ProtK</b>	4	86,0	1,9	73,9	2,4	73,4	2,1	76,9	1,7
	<b>6h</b>	<b>1h ProtK</b>	4	80,4	4,4	73,8	1	75,7	1,9	76,6	1
		<b>2h ProtK</b>	4	85,1	3,7	73,9	1,7	73,9	4	77,6	1

**F9. Táblázat** Vérminták különböző tárolási kondícióinak LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata skDNS mintákban. RT: szobahőmérséklet, 3h: buffy coat- és plazmaszeparálás 3 óra tárolás után, 6h: buffy coat- és plazmaszeparálás 6 óra tárolás után.

Változók			n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
				CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag CpG	SD
<b>K3EDTA</b>	<b>0h</b>	<b>RT</b>	4	86,3	8,2	79,3	3,8	77,2	4,5	81,0	4,5
		<b>3h</b>	<b>RT</b>	4	88,8	5,2	77,6	2,9	76,0	1,5	80,8
	<b>4°C</b>		4	83,7	2,1	77,2	3,7	77,3	3,4	79,4	2,7
	<b>6h</b>	<b>RT</b>	4	85,1	3,5	76,9	2,7	78,0	3,0	78,0	1,6
		<b>4°C</b>	4	82,2	6,0	77,6	3,2	75,5	7,3	80,0	4,0
	<b>Roche</b>	<b>0h</b>	<b>RT</b>	4	87,2	7,1	82,0	2,6	78,1	2,4	82,4
<b>3h</b>		<b>RT</b>	4	87,1	2,1	81,2	2,1	83,1	3,2	83,8	3,5
<b>6h</b>		<b>RT</b>	4	85,7	3,2	79,6	1,2	79,8	3,3	81,7	1,9

**F10. Táblázat** Életkor és nemek LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ .

Változók			n	Metilációs szint $\pm$ SD (%)							
				CpG1	SD	CpG2	SD	CpG3	SD	Átlag CpG	SD
<b>Nő</b>	<b>&lt;40</b>	9	81,4	3	76,7	1,4	76,2	2,2	78,1*	1,0	
	<b>&gt;40</b>	21	79,3	2,6	76,1	2,2	75,3	2,7	76,9	1,8	
<b>Férfi</b>	<b>&lt;40</b>	5	80,6	3,8	78,2	1,5	75,6	1,7	78,1	1,3	
	<b>&gt;40</b>	10	80,6	3,4	77,7	2,5	75,6	1,9	78,0	1,9	

**F1. Ábra** Az *APOBEC1*, *APOBEC3B*, valamint *DNMT1* mRNS-expressziós változása a kolorektális normál-adenóma-karcinóma szekvencia mentén. A hőtérkép zöld színe csökkent, piros színe növekedett transzkriptumszintet jelöl. Minden sor különböző gént, míg minden oszlop eltérő mintacsoportot ábrázol. Statisztikai szignifikancia: \*  $p \leq 0,05$ , AD: kolorektális adenóma, CRC: kolorektális karcinóma, N: egészséges.

