

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

Doktori tézisek

dr. Zsigrai Sára

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

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

Budapest

2022

1. BEVEZETÉS

Az epigenetikai folyamatok úgy befolyásolják a genom által kódolt információ kifejeződését, hogy nem változtatják meg a nukleotidok sorrendjét a DNS-ben. A legismertebb epigenetikai módosulás a DNS-metiláció, amely a promóter szakaszokat érintve a gének elcsendesítéséhez vezet. A DNS-metiláció leggyakrabban azokon a citozin nukleobázisokon következik be, amelyeket guanin követ a szekvenciában (CpG-hely). A metil-csoportot az S-adenozil-metionin (SAM) molekula szolgáltatja a DNS-metil-transzferáz (DNMT) enzimek által katalizált reakcióban.

Az életkor előrehaladtával, valamint a daganatok (pl. vastagbél-, tüdő-, prosztatata- és emlőrák) progressziója során sajátos változások következnek be a DNS-metilációs mintázatban, amelyek magukban foglalják a promóter hipermetilációt és a genomszintű (globális) hipometilációt. Míg az előbbi a tumorszuppresszor gének elcsendesítése révén segíti elő a sejtek kontroll nélküli osztódását, az utóbbi az onkogének, továbbá a mobilis genetikai elemek (transzpozonok) aktiválásával vezethet daganatos progresszióhoz. A transzpozonok hipometilációjukat követően véletlenszerűen épülhetnek be más génekbe, ezáltal genomiális instabilitást előidézve.

A DNS-metilációs változások reverzibilis folyamatként ígéretes daganatterápiás lehetőségek alapját képezhetik, ezért napjainkban nagy figyelem irányul rájuk. Kimutatták, hogy a tápanyagok globálisan és CpG-helyre specifikusan is képesek befolyásolni ezt a mintázatot. Ilyen szerepet tölt be többek között azoknak a molekuláknak a fogyasztása is, amelyek hozzájárulnak a SAM-szint változásához. A SAM képződése egy komplex biológiai rendszeren keresztül történik, amelyet egy szénatomos (1C; one-carbon) metabolizmusnak nevezünk. Ebben a folyamatban a táplálékkal felvett folát (B₉-vitamin) 5-metil-tetrahidrofoláttá alakulva adja át metilcsoportját a metioninnak, amely ezt követően a SAM-ra, és végül a DNS-re kerül.

A természetes folátokat elsősorban leveles zöldségek fogyasztásával vihetjük be a szervezetünkbe. Szintetikus formája, a folsav, azonban stabil molekulaszervezetéből kifolyólag táplálékkiegészítőként, valamint kemoterápiás szerek kiegészítő kezelésekként használható. A folsav a SAM-szintézisben betöltött szerepe mellett elengedhetetlen az aminosavak és a nukleotidok képzésében is. Ezen együttes epigenetikai és genetikai szabályzó funkciója a karcinogenezis szempontjából érdekes módon nyilvánul meg, amelyet mindenképpen ajánlatos figyelembe venni a daganatok megelőzése vagy gyógyítása szempontjából. A folsav ugyanis az egészséges szervezetben a nukleotidszintézis elősegítése által akadályozza meg az uracil hibás beépüléséből adódó pontmutációk létrejöttét, valamint késlelteti a globális hipometiláció kialakulását. Rákelőző állapot

fennállása esetén azonban a fokozott nukleotidszintézis révén serkenti a daganatos sejtek növekedését, továbbá elcsendesítheti a tumorszuppresszor géneket is.

A SAM minden sejtünk citoplazmájában szintetizálódik, és az ATP-t követően a legtöbb reakcióban részt vevő kofaktor molekulánk. Főként transzmetilációra használódik fel, mely során átadja metilcsoportját a DNS, RNS, hormonok, lipidek és neurotranszmitterek számára. Emellett azonban részt vesz a glutation, valamint a poliaminok szintéziséhez szükséges transzszulfurációs és aminopropilációs folyamatokban is. Számos *in vitro* és *in vivo* SAM-mal végzett kísérlet bizonyítja, hogy a molekula alkalmas a különböző daganatos betegségek progressziójának gátlásában. A folyamat háttérében álló mechanizmusok nem teljesen tisztázottak, de feltételezhető, hogy a SAM szelektíven hat azokra az útvonalakra, amelyek a daganatos sejtekben eltérnek az egészségeshez képest. Míg hipometiláció által aktiválhatja a tumorszuppresszor géneket, remetilációval a protoonkogének elcsendesítéséhez vezethet, továbbá támogatja a genomiális stabilitást. Használatát követően megfigyelhető, hogy a hiper- és hipometilációs változások egyensúlyban vannak, tehát metilom modulátor szerepet tölt be.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

Céljaim a következők voltak:

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

3. MÓDSZEREK

3.1. A sejtvonalak kezelése

A sejtvonalak kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy a leggyakoribb CRC kialakulási útvonal, a kromoszómális instabilitás (CIN; chromosomal instability) jellegzetességeit mutassák, azonban a tumor heterogenitás vizsgálata szempontjából rendelkezzenek alapvető genomiális és epigenomiális különbségekkel. Így a CIN+, CIMP+ (CpG island methylator phenotype; CpG-sziget metilátor fenotípus) és *BRAF* mutáns HT-29, valamint a CIN+, CIMP- és *KRAS* mutáns SW480 sejtek használata mellett döntöttünk. A vizsgált sejtvonalak a CRC-k transzkriptomikai jellegzetességein alapuló CMS osztályozás szerint is külön csoportba tartoznak. Ennek alapján a HT-29 sejtek a metabolikai szabályozási zavarral jellemzett CMS3, míg az SW480 sejtek a TGF β /integrin útvonal aktivációt, epitheliális-mezenchimális tranzíciót (EMT), valamint erőteljes stromális inváziót és angiogenezist mutató CMS4 osztály részét képezik.

Folsavval történő kísérleteink során a folsavmentes közeg (0 ng/mL) mellett a fiziológias pótlással biztosítható 100 ng/mL, valamint egy szélsőségesen magas folsavdózis, a 10.000 ng/mL adására került sor. A 72 órás folsavkezelést megelőzően az RPMI 1640 tenyésztő médiumot folsavmentes tápfolyadékra cseréltük és a szilárd halmazállapotú folsavat a gyártói utasításoknak megfelelően 1 M-os NaOH-ban oldottuk. Ennek megfelelően létrehoztunk olyan kontroll mintákat is, amelyekhez ugyanakkora mennyiségű NaOH-ot adtunk, mint amennyit a kezeléseknél alkalmaztunk. A kontrollok eredményeit végül kivontuk a folsavval kezelt minták eredményeiből, hogy követhessük a folsav egyéni hatását a sejteken. Az összes mintatípus esetében három párhuzamost használtunk. A SAM kezelések protokollja lényegében megegyezett a folsav esetében leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy 72 óra helyett 48 órán keresztül alkalmaztuk a kezelőszert. A sejteket a tenyésztés ideje alatt az eredeti tápfolyadékukban, tehát folsavas RPMI 1640-ben tartottuk és irodalmi adatok, valamint saját citotoxicitási eredményeink alapján 0,5 és 1 mmol/L SAM-koncentrációt alkalmaztunk.

3.2. Sejtproliferáció, sejtvitalitás és sejtciklus vizsgálata

A sejtek osztódási ütemét *szulforodamin B* (SRB) teszttel vizsgáltuk, amely a sejttömeg meghatározásával nyújtott információt a proliferáció mértékéről. A sejtek életképességét (vitalitását) pedig az elektrontranszportlánc aktivitásának vizsgálatán alapuló *AlamarBlue* módszerrel detektáltuk. A sejtvitalitás és sejtproliferáció arányát azokhoz a mintákhoz viszonyítottuk, amelyeket az eredeti tenyésztőmédiumban (folsavas RPMI 1640) tartottuk. A

sejtciklusban bekövetkező változásokat *FACS* (fluorescence-activated cell sorting; fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás) módszer segítségével figyeltük meg a kezeléseket követően.

3.3. Genomiális instabilitás vizsgálata

A genomiális instabilitás szintjét a legsúlyosabb DNS-t érintő károsodás, a DNS-kettőtörés kimutatására alkalmas módszerekkel mértük. Ezen károsodás fennállása esetén kromoszóma-szegmentumok vagy teljes kromoszómák kerülhetnek ki a sejtmagból a sejtosztódás alkalmával, amelyek mikronukleuszok képében jelennek meg. A mikronukleuszok számának sejtszámra vonatkoztatott meghatározása, azaz a *mikronukleusz-számolás* volt az egyik genomiális instabilitási markerünk. A DNS-kettőtörések kijavításakor a H2AX hiszton foszforilálódik, így γ -H2AX képződik, amit *immunfestéssel* jelöltünk. A törött DNS-darabok elektroforézis hatására gyorsabban vándorolnak az agaróz gélben, mint az ép genomiális részek, így csóvákat formálnak, amelyek hosszából szintén a genomiális instabilitás mértékére következtettünk az ún. *comet próba* során.

3.4. Statisztikai számítások

A szignifikancia ($p \leq 0,05$) megállapításához először egy Shapiro-Wilk-normalitásvizsgálatot végeztünk. Amennyiben egy adott kísérleten belül nem állt fenn normalitás bármely sejtvonal vagy kezelőszer esetében, úgy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk Dunn-féle többszörös összehasonlítással kiegészítve. Normál eloszlás esetén egyszempontos ANOVA-val (analysis of variance; varianciaanalízis) és Tukey-féle post-hoc teszttel számoltuk ki a szignifikanciaértéket. Az áramlási citometriás vizsgálatoknál, a többi kísérlettől eltérően, kétszempontos varianciaanalízist használtunk.

3.5. DNS-metiláció vizsgálata

A kezelt sejtekből izolált DNS-mintákat három különböző epigenetikai vizsgálattal elemeztük. A globális DNS-metilációs értéket a LINE-1 (long interspersed nuclear element-1; hosszú közbeiktatott sejtmagi egység-1) transzpozonok három CpG-pozíciójának metilációs átlaga adta meg *piroszekvenálást* követően. Az ún. *RRBS* (Reduced Representation Bisulfite Sequencing; csökkentett reprezentáltságú biszulfid szekvenálás) módszerrel lehetőségünk nyílt a biológiailag releváns metilációs régiók génszintű vizsgálatára újgenerációs szekvenálás alkalmazásával. Ennek során olyan sejteket elemeztünk, amelyeket folsavmentes vagy 10.000 ng/mL folsavat tartalmazó médiumban tartottunk, valamint 0 vagy 1 mmol/L SAM-koncentrációval kezeltünk. A változások által érintett gének számát és a DMS-ek (differentially methylated site; megváltozott metilációs értéket adó hely)

eloszlását kördiagramon ábrázoltuk. Végül útvonalelemzést hajtottunk végre és hőtérképen jelenítettük meg azt a 10 biokémiai folyamatot, amelyek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) a legtöbb DNS-metilációs változással rendelkeztek. A szintén újgenerációs szekvenáláson alapuló *bead array* módszerrel 850.000 metilációs hely vizsgálatát végeztük el szerte a genomban a SAM-mal történő kezeléseinket követően. A tíz legnagyobb hipo- vagy hipermetilációs változást ($\Delta\beta$) mutató CpG-hellyel rendelkező gént hőtérképen ábrázoltuk.

3.6. Genomszintű génextpressziós változások vizsgálata

A kezelt sejtek mRNS-tartalmából komplementer DNS-szálakat készítettünk, amelyeket a *HTA 2.0* (Human Transcriptome Array 2.0; Humán Transzkriptom Array 2.0) *mikroarray*-hez hibridizáltatva kaptunk képet a transzkriptomikai változásokról a génaktivációra utaló fluoreszcens jelek detektálása által. Számszerűsítettük a szignifikáns ($p \leq 0,05$), és a legalább $\pm 1,5$ expressziós intenzitáskülönbséget (FC; fold change) mutató transzkriptumokat, valamint a csökkenő és növekvő expressziós változások arányát is. A páros összehasonlításhoz a folsavas kísérlet esetében a kezeletlen (0 ng/mL) és a 10.000 ng/mL koncentrációval kezelt, a SAM-mal történt kísérletek során pedig a 0 és 1 mmol/L SAM koncentrációval ellátott mintákat alkalmaztuk. Ezt követően annotáltuk az említett kritériumoknak megfelelő transzkriptumokat, majd megneveztük a top 10 csökkenő és növekvő FC-vel rendelkező gént, amelyeket vulkándiagramon ábrázoltunk. A folsavval történő kezelés esetében fehérje-fehérje-kölcsönhatás vizsgálatokat végeztünk a Cytoscape szoftver használatával. A SAM-mal folytatott vizsgálataink során négy molekuláris útvonal esetében hőtérképen ábrázoltuk a három kezelési koncentrációnál tapasztalt expressziós különbségeket ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,4|$).

Végül összevetettük a DNS-metilációs és génextpressziós elemzések során kapott génlistákat, hogy összefüggéseket keressünk a promótermetiláció és a génátíródás mértéke között.

3.7. A sejtvonalak mutációs profiljának vizsgálata

A *teljesexom-szekvenálás* lehetővé tette az összes kódoló gén mutációjának vizsgálatát. Kutatásunkban elsődlegesen az onkogénekre és az 1C metabolizmus génjeire fókuszáltunk. A két sejtvonal egyedi mutációs profilját táblázatban jelenítettük meg.

4. EREDMÉNYEK

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

A HT-29 sejtek esetén a legmagasabb sejtproliferációs szintet 100 ng/ml folsavpótlás hatására mértük (HT-29₁₀₀: 128,43 ± 24,94%). Ehhez az értékhez képest a folsavmegvonás (HT-29₀: 101,25 ± 13,53%) és a 10.000 ng/ml folsavkoncentráció (HT-29_{10.000}: 86,06 ± 20,75%) a sejtproliferáció csökkenéséhez vezetett. Az SW480 sejtvonalban ezzel szemben nem figyeltünk meg jelentős változásokat a különböző folsavkoncentrációk esetében (SW480₀: 90,96 ± 9,72%, SW480₁₀₀: 88,75 ± 2,69%, SW480_{10.000}: 84,15 ± 10,67%). A SAM-kezelés mindkét sejtvonalban koncentrációarányosan vezetett a proliferáció csökkenéséhez. A változások a kontroll mintákhoz képest szignifikánsak ($p \leq 0,01$) voltak (HT-29₀: 98,08 ± 9,71%, HT-29_{0,5}: 76,93 ± 4,48%, HT-29₁: 69,54 ± 7,63%; SW480₀: 100,98 ± 10,88%, SW480_{0,5}: 79,00 ± 16,11%, SW480₁: 71,54 ± 21,67%).

A sejtek viabilitása a folsavkezelés hatására a proliferációs elemzések során észlelt eredményekhez hasonlóan változott (HT-29₀: 91,57 ± 13,27%, HT-29₁₀₀: 115,81 ± 30,88%, HT-29_{10.000}: 64,06 ± 20,24%; SW480₀: 90,22 ± 9,55%, SW480₁₀₀: 90,05 ± 5,03%, SW480_{10.000}: 89,72 ± 11,22%). A proliferációs eredményektől eltérően SAM-kezelést követően nem tapasztaltunk változásokat a sejtek életképességét tekintve (HT-29₀: 101,92 ± 9,51%, HT-29_{0,5}: 103,71 ± 6,94%, HT-29₁: 105,07 ± 10,51%; SW480₀: 101,80 ± 10,98%, SW480_{0,5}: 102,43 ± 17,54%, SW480₁: 104,76 ± 15,55%).

A sejtek aránya a különböző fázisokban specifikus volt az adott sejtvonalra, így a HT-29 mintákban G0/G1-, az SW480 sejtekben pedig S-fázis dominanciát vettünk észre. Érdekes módon azonban a folsavkezelés nem befolyásolta lényegesen a sejtciklust (az összes HT-29 minta átlaga: 62,51 ± 4,76% a G0/G1-ben, 17,90 ± 4,32% a G2/M-ben és 19,59 ± 2,12% az S-fázisban; az összes SW480 minta átlaga: 41,31 ± 1,60% a G0/G1-ben, 0,81 ± 0,66% a G2/M-ben és 57,88 ± 1,59% az S-fázisban). SAM használata mellett azonban jelentős változásokat figyelhettünk meg a sejtciklus tekintetében. A kezelés hatására mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan ($p \leq 0,05$) csökkent a G0/G1- (HT-29: 50,00 ± 0,81%-ról 23,31 ± 1,58%-ra; SW480: 46,71 ± 4,59%-ról 17,49 ± 1,49 %-ra), valamint nőtt az S- (HT-29: 39,29 ± 0,28%-ról 59,49 ± 0,25%-ra; SW480: 52,12 ± 2,70%-ról 74,68 ± 1,39%-ra) és G2/M-fázisban (HT-29: 10,76 ± 0,53%-ról 17,21 ± 1,83%-ra; SW480: 1,16 ± 2,01%-ról 7,83 ± 1,66%-ra) lévő sejtek száma.

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

A HT-29 sejtek $0,56 \pm 0,05\%$ -a rendelkezett mikronukleusszal a folsavmentes környezetben, míg a kapott érték a kezelés hatására szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent (HT- 29₁₀₀: $0,17 \pm 0,05\%$, HT-29_{10.000}: $0,25 \pm 0,09\%$). Ezzel szemben folsavhiány mellett az SW480 sejtek $0,79 \pm 0,10\%$ -ának volt mikronukleusza, és ezt az arányt a kezelés nem változtatta meg számottevően (SW480₁₀₀: $0,74 \pm 0,07\%$, SW480_{10.000}: $0,77 \pm 0,16\%$). A SAM-kezelés szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltéréseket okozott mindkét sejtvonal esetében (HT-29₀: $0,19 \pm 0,02\%$, HT-29_{0,5}: $0,25 \pm 0,00\%$, HT-29₁: $0,04 \pm 0,01\%$; SW480₀: $2,75 \pm 0,25\%$, SW480_{0,5}: $1,26 \pm 0,12\%$, SW480₁: $0,91 \pm 0,11\%$). Az SW480 sejteknél azonban nem csupán nagyobb különbségeket tapasztaltunk a HT-29 mintákhoz viszonyítva, de a csökkenés jól láthatóan összhangban volt az alkalmazott SAM-koncentrációval is.

A DAPI-festés mellett anti- γ -H2AX antitestet is alkalmaztunk, és meghatároztuk a γ -H2AX pozitivitást mutató mikronukleuszok arányát az összes mikronukleuszhoz viszonyítva. Azt tapasztaltuk, hogy a kapott értékre nem gyakorolt hatást sem a sejtvonal, sem a kezelés típusa.

A comet próba alkalmazásakor a csóva DNS-mennyisége szolgált a genomiális károsodás mértékének meghatározására. Folsavkezelés hatására a csóva-DNS % a HT-29 mintákban csökkenést mutatott (HT-29₀: $37,35 \pm 3,45\%$, HT-29₁₀₀: $31,23 \pm 3,41\%$, HT-29_{10.000}: $20,07 \pm 3,59\%$), míg az SW480 sejteknél nem tapasztaltunk lényeges változásokat (SW480₀: $58,79 \pm 0,83\%$, SW480₁₀₀: $59,84 \pm 1,89\%$, SW480_{10.000}: $58,24 \pm 2,56\%$). A SAM-kezelés nem volt jelentős hatással a HT-29 sejtek csóva-DNS %-ára (HT-29₀: $62,29 \pm 1,82\%$, HT-29_{0,5}: $59,2 \pm 2,12\%$, HT-29₁: $59,69 \pm 2,81\%$), azonban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) és koncentrációarányosan csökkentette ezt a paramétert az SW480 sejtekben (SW480₀: $64,36 \pm 5,36\%$, SW480_{0,5}: $41,84 \pm 6,75\%$, SW480₁: $35,01 \pm 3,29\%$).

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

A HT-29 sejtek globális DNS-metilációs szintje megközelítőleg 10%-kal volt magasabb, mint az SW480 sejteké. Folsav- és SAM-pótlást követően azonban egyik sejtvonalnál sem figyeltünk meg kiemelkedő változást (folsav: HT-29₀: $59,30 \pm 2,90\%$, HT-29₁₀₀: $61,68 \pm 4,17\%$, HT-29_{10.000}: $60,42 \pm 2,12\%$; SW480₀: $48,76 \pm 4,93\%$, SW480₁₀₀: $49,15 \pm 6,13\%$, SW480_{10.000}: $48,73 \pm 7,27\%$; SAM: HT-29₀: $60,40 \pm 0,99\%$, HT-29_{0,5}: $59,89 \pm 0,68\%$, HT-29₁: $60,14 \pm 0,64\%$; SW480₀: $50,58 \pm 0,71\%$, SW480_{0,5}: $52,08 \pm 1,32\%$, SW480₁: $48,65 \pm 0,64\%$). RRBS vizsgálat által nyújtott génszintű DNS-metilációs eredmények a két kezelőszer esetében hasonlóak voltak. Folsavpótlás hatására a hipermetilálódott (HT-29_{hiper}: 3591; SW480_{hiper}: 3698) és hipometilálódott (HT-29_{hipo}: 3432; SW480_{hipo}: 3422) CpG-helyekkel rendelkező gének száma sejtvonalon belül, és a két sejttípus között

is hasonló volt. A metilációs helyek többsége mindkét sejtnél a heterokromatin, valamint az aktív és gyenge promóter szakaszokra esett. SAM-kezelést követően a metiláció által érintett gének száma lényegesen magasabb volt a HT-29 sejtek esetében az SW480-hoz, valamint a folsavas kezelés mintáihoz viszonyítva is. Emellett ebben a sejtvonalban enyhe eltérés mutatkozott a hipometilálódó gének javára (HT-29_{hiper}: 8333; HT-29_{hipo}: 8753), míg az SW480 sejteknél a két csoport génjeinek száma (SW480_{hiper}: 6407; SW480_{hipo}: 6407) megegyezett. SAM-adás hatására a HT-29 sejteknél dominánsan a heterokromatin régióban következtek be metilációs változások, amit a represszor szakasz követett, míg az SW480 sejtek esetében az aktív és a gyenge promóterekben tapasztaltuk a legtöbb változó metilációt mutató helyet. A KEGG útvonal-analízis eredményei alapján elsősorban a karcinogenezisben szerepet játszó géneket érintették a metilációs változások mindkét kezelőszer és sejtvonal esetén.

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

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

Megfigyeltük, hogy a folsav adását követően a csökkent kifejeződést mutató transzkriptumok száma dominált, ami főként a HT-29 sejteknél volt szembevetendő (HT-29: 78,82% alul- és 21,18% felülexpresszáldott; SW480: 60,60% alul- és 39,40% felülexpresszáldott). Azonban a megváltozott expresszióval rendelkező transzkriptumok száma (HT-29: 458; SW480: 769) és a változások mértéke (FC) is az SW480 sejtekben bizonyult nagyobbak. A HT-29 sejtekben a *HES1* gén két transzkriptuma rendelkezett a legmagasabb FC-értékkel (FC: 4,98 és 3,27), míg a *FAM95B1* gén két transzkriptuma mutatta a legnagyobb expressziós csökkenést (FC: -3,15 és -3,15) a kezelést követően. Az SW480 sejtvonalban az *SLC7A11* gén kifejeződésében figyeltük meg a legnagyobb növekedést (FC: 5,12), a *CCL2* génben pedig a legnagyobb csökkenést (FC: -5,90) folsavadás után. Folsavpótlást követően nem tapasztaltunk szignifikáns transzkriptomikai változásokat ismert biokémiai folyamatokban. A fehérje-fehérje-kölcsönhatási hálózat összetettebb volt az SW480 sejtvonalban a HT-29-hez viszonyítva (HT-29: 113 csomópont és 82 összeköttetés; SW480: 186 csomópont és 221 összeköttetés). A kapcsolatok száma alapján a HT-29 sejteknél a YWHAZ (11 összeköttetés), míg az SW480 sejteknél a TNF (27 összeköttetés) volt a hálózat kulcsfehérjéje.

SAM-kezelés hatására a HT-29 sejtekben közel egyforma arányban fordultak elő az emelkedett (50,17%) és a csökkent (49,83%) kifejeződést mutató transzkriptumok. Ezzel szemben az SW480 sejteknél jelentősen domináltak azok, amelyeknek növekedett az átíródása (26,21% alul- és 73,79% felülexpresszáldott). Az érintett transzkriptumok száma (HT-29: 2290; SW480: 2598) a folsavas kísérletekhez hasonlóan itt is az SW480 sejtek esetében volt magasabb, azonban ezek az értékek többszöröse voltak annak mint, amit a folsavpótlást követően mértünk. A pozitív és negatív irányú változások kiterjedtségében szintén lényegesen nagyobb különbségek mutatkoztak a SAM-kezelés hatására a folsav adásához képest. A HT-29 sejtek esetében a *MIR4521* génhez társítható transzkriptumoknak detektáltuk a legnagyobb pozitív irányú változását (FC: 50,64, 50,64, 47,78, 45,3, 39,75), a legalacsonyabb FC-értéket pedig a *SNORD82* génnél figyeltük meg (FC: -20,22). Az SW480 sejtekben a *CST4* gén expressziója növekedett a legnagyobb mértékben (FC: 30,60) és csakúgy, mint a folsav adását követően, a *CCL2* gén esetében tapasztaltuk a legmagasabb intenzitáscsökkenést (FC: -9,47). A SAM nem csak az érintett gének számát és kifejeződésük mértékét tekintve volt jelentős hatással a transzkripcióra, hanem a mintázatát illetően is. A kezelés ugyanis számottevően befolyásolt több tumorprogresszió szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró útvonalat. A Bakhom és munkatársai által összeállított, kromoszomálisan instabil ráksejtekre jellemző EMT/migráció/metasztázis csoport génjei közül mindegyik, amelyik megfelelt a kritériumainknak ($p \leq 0,05$ és $FC \geq |1,4|$), alacsonyabb expressziót mutatott a kezelés hatására. A kolorektális karcinogenezisre jellemző EMT vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a folyamatban részt vevő gének nagy hányadának kisebb lett a kifejeződése. A *TGFBI* mindkét sejtvonal esetében kiemelt helyet foglalt el a kezelés hatására csökkenő expressziót mutató gének listáján (HT-29: -6,91; SW480: -4,52). SAM-adás hatására a genomiális stabilitásért felelős gének is jelentős expressziós változásokat mutattak. A DNS-hibajavító útvonal esetében mindkét sejtvonalnál csökkent számos gén, köztük az *CASP8*, *PRKDC* és *SFN* expressziója. A hisztonmódosulásokban részt vevő gének kifejeződése azonban eltérően változott a két sejtvonalban. Míg a HT-29 sejteknél a *SETD2* kivételével mindegyik gén expressziója csökkent, az SW480 mintákban inkább az intenzitásnövekedés volt jellemző a kezelést követően.

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

Folsavpótlást követően a HT-29 sejtekben négy, az SW480 sejtekben pedig öt gén promóterének metilálódásához tudtunk csökkenő expressziós értékeket társítani. A promóter-hipometiláció a HT-29 minták esetében tíz, az SW480 sejtvonalnál azonban nyolc génnél volt összeegyeztethető a megnövekedett transzkripcióval. SAM-kezelés hatására a fentebb ismertetett eredményekhez képest

lényegesen szorosabb kapcsolatot találtunk a promótermetilációs státusz és a génexpresszió között. A HT-29 sejtekben 193, az SW480 sejtekben pedig 216 gén promóterének hipermetilációja volt egyidejűleg megfigyelhető csökkent kifejeződésével. A kezelés következtében hipometilálódó promóter régió, és ezzel párhuzamosan a megnövekedett expressziós intenzitás a HT-29 sejtekben 102, az SW480 sejtekben azonban 204 gént érintett.

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

A teljesexom-szekvenálás elemzésénél először azokra a génekre fókuszáltunk, amelyek az OnkoKB adatbázis alapján feltételezhetően onkogén funkciót látnak el. Számos hasonlóságot vettünk észre a sejtvonalak között, ugyanis mindkettő sejtípus *ARID4B*, *DNMT3B*, *ERBB2*, *HLA-A*, *HLA-B*, *KDR*, *KIT*, *KMT2C*, *MLH1* és *TP53* mutáns volt ugyanarra az allélra. Azonban csak a HT-29 bizonyult *BRAF*, *EGFR*, *PIK3CA*, *SMAD4* mutánsnak, és egyedül az SW480 sejteknél mutattunk ki *KRAS*, valamint *MSH6* mutációt. Megvizsgáltuk azoknak a géneknek az érintettségét is, amelyek az 1C metabolizmus enzimeit kódolják. A 30 vizsgált fehérje közül kilencnél volt megfigyelhető valamilyen mutáció a HT-29 és szintén kilencnél az SW480 sejtekben, míg nyolc mutáció mindkét sejtvonalat érintett. A tanulmányozott enzimek közül a folsav- és SAM-hatás szempontjából az MTHFR-nek és a DNMT-knek van a legnagyobb jelentősége. A szekvenálási adatokból kiderült, hogy a HT-29 sejtek heterozigóták az MTHFR enzim C677T (A222V) és A1298C (E429A) variánsaira, az SW480 sejtek pedig homozigóták a C677T (A222V) variánsra. A DNS-metiláló enzimek esetében kimutattuk, hogy a *DNMT1* az SW480 sejtekben, a *DNMT3b* pedig mindkét sejtvonalban mutált volt.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

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

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

A folsav a SAM prekursor molekulájának tekinthető a DNS-metilációs folyamatokban. Feltételezéseink szerint ez a fennálló biokémiai kapcsolatrendszer vezetett a kezelőszerek hasonló, a SAM-mal korábban már összefüggésbe hozott, metilommodifikáló hatásához. Használatuk ugyanis előszörban a karcinogenezis útvonalaiban idézett elő epigenetikai újraprogramozást, amelynek során a hipo- és hipermetilációs változások szintjében viszonylagos egyensúlyt tapasztaltunk. Bár a kezelést követően összefüggéseket találtunk a promóter szakaszok metilációs státusza és a transzkripció esetleges növekedése vagy csökkenése között, mégis azt valószínűsítjük, hogy egyéb folsav és SAM által előidézett mechanizmusok (pl. hisztonmetiláció) is szerepet játszottak a génexpresszió

szabályozásában.

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

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

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

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

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

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

6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények

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

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

Szigeti KA, Kalmár A, Galamb O, Valcz G, Barták BK, Nagy ZB, **Zsigrai S**, Felletár I, V Patai Á, Micsik T, Papp M, Márkus E, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2022) Global DNA hypomethylation of colorectal tumours detected in tissue and liquid biopsies may be related to

decreased methyl-donor content. *BMC Cancer*, 22(1):605. doi: 10.1186/s12885-022-09659-1. **IF: 4,638***

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

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

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

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

Valcz G, Buzás EI, Kittel Á, Krenács T, Visnovitz T, Spisák S, Török G, Homolya L, **Zsigrai S**, Kiszler G, Antalffy G, Pálóczi K, Szállási Z, Szabó V, Sebestyén A, Solymosi N, Kalmár A, Dede K, Lőrincz P, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2019) En bloc release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. *J Extracell Vesicles*, 8(1):1596668. doi: 10.1080/20013078.2019.1596668. **IF: 14,976**

∑IF: 52,814

*várható impaktfaktor érték

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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