

# 111743 azonosító számú, "Epigenetikai eltérések diagnosztikus jelentőségének vizsgálata a vastagbél- és gyomorrák rákelőző állapotokban" című kutatás – záró beszámoló (2015.01.01.-2018.12.31.)

2015.01.01-2015.12.31.

2015-ben a kolorektális adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia epigenetikai eltéréseit vizsgáltuk. Az egyik tanulmányban a DNS metilációs profil változásait, valamint a KRAS és BRAF mutációkat elemeztük kolorektális rák (CRC) kifejlődése során. Eredményeink azt mutatják, hogy specifikus metilációs mintázat jellemző a mikrosatellita stabil (MSS) CRC-re, ami a rákmegelőző elváltozásokban is megjelenik. Egy tíz génből álló marker csoportot azonosítottunk, amelyek jóindulatú és rosszindulatú vastagbél tumorokban fokozottan metiláltak. Érdekes, hogy a rákmegelőző léziókban több hipermetilált gén azonosítható nagyobb metilációs intenzitással, mint CRC-ben, ha egyidejűleg fennálló alacsony fokú diszplázia (LGD) és CRC párokat hasonlítottunk össze. A fenti jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy a hiperproliferatív prekursor lézióban magasabb az epitélium-stróma arány, mint CRC-ben. Másrészt, mivel a rákos sejtek a diszplasztikus sejtekből fejlődnek ki, a CRC minták szignifikáns mennyiségű diszplasztikus (de még nem rákos) sejtet tartalmazhatnak. Ebben az esetben az azonosított 10 gén a diszplasztikus mintákra lehet specifikus és megjelenésüket a CRC mintákban a CRC minták diszplasztikus sejt „kontaminációja” okozhatja. A fenti 10 marker gén további jellemzése nem eredményezett közös tulajdonságokat, mivel a gének 7 különböző kromoszómán helyezkednek el és eltérő biológiai funkcióval rendelkeznek. Igazoltuk továbbá, hogy az áttétes CRC-ket eltérő DNS metilációs mintázat jellemzi, a rákmegelőző léziókra és CRC-re jellemző hipermetilált gének többsége ugyanis nem metilált áttétes CRC-ben. Eredményeink azt mutatják, hogy a 10-ből 7 gén mRNS expressziója csökken a tumoros mintákban és ez a lecsökkent kifejeződés részben visszaállítható (növelhető) demetilációs kezeléssel. A fentiek arra utalnak, hogy a DNS hipermetiláció szerepet játszhat ezen gének szabályozásában és a demetilációs kezelés potenciálisan megfordíthatja ezeket a változásokat egy még felfedezésre váró háttérmechanizmust feltételezve, amelynek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek. Ezek közül az SFRP1 fehérjeszintű elemzését is elvégeztük, amely során az SFRP1 fehérje szintjének csökkenését tapasztaltuk az ép mintákéhoz képest. Az SFRP1 esetén tapasztaltak egyeznek az irodalomban leírtakkal, mely szerint az SFRP1 promóter hipermetilációjának következménye a gén csökkent működése, amely hozzájárul a tumor képződéshez. Az SFRP1 hipermetilációja korai esemény a CRC kialakulása során, ezért a CRC korai felismerését célzó tanulmányokban való hasznosítását teszi lehetővé. Ha a mutációk és a tumorokban hipermetilált gének gyakoriságát hasonlítjuk össze, akkor megfigyelhető, hogy a metilált gének szignifikánsan nagyobb számban fordulnak elő, mint a mutációk. 10 olyan gént azonosítottunk, amelyek a vizsgált minták több, mint 85%-ában fokozottan metilálódtak, míg a mutációk kevésbé bizonyultak gyakorinak. Mindez arra utalhat, hogy a DNS metiláció jóval nagyobb szerepet játszhat a kolorektális karcinogenezisben, mint azt korábban feltételezték. Az ún. field effect vizsgálatára a tumortól 1cm-re, illetve 10cm-re lévő makroszkóposan ép vastagbél nyálkahártya területről vett mintákat elemeztünk és azt tapasztaltuk, hogy ezek metilációs mintázata az ép kontroll mintákéhoz hasonló, így ebben a tanulmányban elemzett gének esetén nem figyeltünk meg field effect-et. A krónikus gyulladás tekintetében, tanulmányunk nem eredményezett olyan DNS metilációs markert, amely prediktívnek bizonyult volna colitis ulcerosa talaján kialakuló CRC-re. **(1)**

Egy másik 2015-ös tanulmányunkban az adenoma-diszplázia-CRC szekvenciára jellemző potenciális biomarkerek kiválasztása történt teljes genom szintű génexpressziós adatok alapján, majd ezek DNS metilációs elemzését és a szabályozó mikroRNS-ek predikcióját és expressziós változásait validációját végeztük. A markerek kiválasztása után az adenoma-karcinóma átmenet DNS metilációs és mikroRNS markereit azonosítottuk. Olyan 18 génből álló marker csoportot határoztunk meg, amelyek folyamatos génexpressziós eltérést mutattak a CRC kifejlődése mentén. A microarray elemzések 12 (BCL2, CDX1, CYP27B1, ENTPD5, MAL, PRIMA1, PTGDR, PTGS2, SFRP1, SOCS3, SULT1A1 és TIMP1) olyan gént azonosítottunk, amelyek adenomákban eltérően fejeződtek ki a kontroll mintákhoz képest, míg 6 gén (ALDH1A3, COL1A2, FADS1, SFRP1, SULF1 és THBS2) csak a CRC-re jellemző génexpressziós mintázatot mutatott. Ha a CRC kialakulásának különböző fázisaiban szereplő sejt típusok szintjén vizsgáldtunk, akkor azt állapítottuk meg, hogy adenomában a hámsejtekben csökkent a SOCS3 és a PRIMA1 szintje, míg CRC-ben a BCL2, a CYP27B1, a COL1A2, a FADS1, és a SULT1A1 expressziója mérséklődött. Az azonosított marker szett tagjai közül a COL1A2, az SFRP2 és a SOCS3 fokozottan metilálódott, míg a THBS2 alacsonyabb metilációs szintet mutatott adenomában és CRC-ben egyaránt az ép területről vett (normal adjacent tissue = NAT) mintákhoz képest. Eredményeink alapján a MAL, a PRIMA1, a PTGDR és az SFRP1 kifejeződése csökkent, ezeknek a géneknek a promóterében a CRC kialakulása során jelentkező fokozott DNS metilációval párhuzamosan. Ezzel ellentétben a BCL2, a CDX1, az ENTPD5 és a SULT1A1 alacsonyabb kifejeződése nem társult szignifikáns DNS metilációs eltérésekkel, így a fenti gének esetében az expresszió csökkenés hátterében egyéb szabályozó folyamatok állhatnak. A DNS metilációs változások fehérje kifejeződésre gyakorolt hatását szintén tanulmányoztuk. Szignifikánsan csökkenő SFRP1 fehérje szinteket mutattunk ki az adenoma-karcinóma szekvencia előrehaladása során. A kolorektális adenoma-karcinóma szekvencia mentén fokozódó expressziójú mikroRNS-eket is meghatároztunk limitált mintahalmazon. A miR-21 kifejeződése nagymértékben növekedett adenoma és CRC mintákban a NAT kontrollhoz képest. Az *in silico* célpont predikciós eredmények alapján a miR-21 célozhatja azokat a géneket a CRC kialakulása során, amelyek promóterében nem találtunk DNS metilációs változásokat (például a BCL2, a MAL és a PTGS2), így ezek expresszióját szabályozhatja. Ezeknek a kis nem-kódoló RNS-eknek alapvető szerepük lehet a CRC progressziója során, ugyanis például a miR-21 a rövidebb túlélés előrejelzőjének bizonyult és részt vehet a megnövekedett proliferáció, migráció és invázió előidézésében. **(2)**

Szintén 2015-ben jelent meg az a tanulmányunk, amelyben DNS metilációs elemzéssel a MAL, az SFRP1 és SFRP2 gének promóterének hipermetilációját tapasztaltuk, amely formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintákon is megbízhatóan kimutatható. Ez azt jelzi, hogy megbízható MS-HRM metilációs adatok nyerhetőek FFPE mintákból is, bár az archivált (5 évesnél régebbi) minták esetén nagy szórásúak voltak a párhuzamos tesztek eredményei, így ezeknek a mintáknak az elemzése nagy körültekintést igényel és több párhuzamos reakció alkalmazását teszi szükségessé (például a gyomorminták elemzésénél). A két alkalmazott, kereskedelmi forgalomban elérhető FFPE DNS izolációs kit által nyújtott DNS mennyiségi kihozatal és tisztaság kis mértékben eltért, amely hatással lehet a későbbi DNS metilációs vizsgálatok minőségére. A nagyobb kihozatalú biztosító QIAamp kit alkalmasabb lehet a nemrégiben fixált FFPE mintákból történő DNS kivonásra, míg a High Pure kit a régebben archivált FFPE minták esetén nyújtott megbízhatóbb eredményeket. **(3)**

Járolékos eredményként azt találtuk, hogy a DNMT3 kifejeződését célzó faktorok újra-expressziója szignifikánsan csökkentette a tumor növekedést. A tumor DNS-sel történt kezelést követően fokozott DNMT3a kifejeződés kapcsolatot feltételez a tumorszövet eredetű DNS metilációs státusza és a tumor-eredetű DNS szekvenciák DNS érzékelő receptorokon keresztüli hatásmechanizmusa között.

Az OTKA projekt támogatásával magyar és angol nyelvű összefoglaló közlemények is közlésre kerültek, amelyek a DNS metiláció kolorektális karcinogenezisben betöltött szerepét és fontosságát mutatják be.

2016-os összefoglaló cikkünkben a keringő szabad nukleinsavak, mint potenciális biomarkerek szerepét mutattuk be a CRC szűrésében és diagnosztikájában. Az egyik leggyakoribb daganatos megbetegedés, a vastagbélrák (CRC) szűrésére alkalmazott módszereknek több korlátozó tényezője ismert. Napjainkban a CRC egyik lehetséges szűrőmódszeréeként a keringő szabad DNS (cfDNS) vizsgálata is felmerül. A CRC-re jellemző genetikai (mutációk) és epigenetikai (DNS metiláció) cfDNS eltérések elemzése elősegíthetik a betegség korai felismerését. Összefoglaló cikkünkben a vastagbélrák perifériás vérből vizsgálható nukleinsav biomarkereit és potenciális szűrőmarkerként való használatukat mutatjuk be. CRC-s betegek plazmamintái esetén a DNS metilációs markerek szenzitivitása magasabbnak adódik a mutációkéhoz képest. A keringő mikroRNS-ek hatékonyabbak CRC detektálására, mint a keringő mRNS markerok. Napjainkban folyik a keringő DNS kivonás automatizálása, így jól reprodukálható és nagy áteresztőképességű módszerré válik. Az automatizálás megoldásával a folyadék biopszia elemzése a CRC szűrésére alkalmas új diagnosztikai eszközzé válhat. **(4)**

2016-os kísérletes tanulmányunkban a WNT jelátviteli út epigenetikai szempontú vizsgálatát végeztük. A WNT jelátviteli út alapvető szerepet játszik a genetikai és epigenetikai változások felhalmozódásával létrejövő kolorektális rák (CRC) kifejlődésében és előrehaladásában. A WNT útvonal génei promóter és géntest régióinak DNS metilációs vizsgálatát végeztük 9 CRC, 15 adenoma és 6 ép területről (NAT) vett szövetminta teljes genom szintű methyl capture szekvenálásával. A DNS metilációs változásokat 5-aza-2'-deoxicitidinnel kezelt CRC sejtvonalak adatainak felhasználásával erősítettük meg. Egyidejűleg az APC és a  $\beta$ -katenin WNT út gének mutációit is elemeztük GS Junior 454 platformon. A legtöbb metilációs eltérést a WNT útvonal gének géntest régióiban azonosítottuk (95%). A 160 elemzett WNT útvonal génből 33 promóterében (hipermetilált AXIN2, CHP1, PRICKLE1, SFRP1, SFRP2, SOX17, valamint hipometilált CACYBP, CTNNB1, MYC) találtunk DNS metilációs különbséget a tumoros és az ép minták között, 44 gén promóterében az adenoma vs. NAT, valamint 41 gén promóterében a CRC vs. adenoma összehasonlításban. Az AXIN2, a DKK1, a VANGL1 és a WNT5A gén promóterek CRC-ben mutatkoztak erősebben metiláltnak, míg a SOX17, a PRICKLE, a DAAM2 és a MYC gének promóterének metilációja adenomában volt intenzívebb a CRC-s mintákhoz képest. A promóteres DNS metiláció és a génexpresszió közötti inverz kapcsolatot 23 gén, köztük az APC, a CHP1, a PRICKLE1, a PSEN1 és az SFRP1 gének esetében tapasztaltuk. A DNS metilációs eltérések mind a kanonikus, mind a nem-kanonikus WNT útvonalat érintették és már a kolorektális karcinogenezis korai szakaszában jelentkeztek. **(5)**

Az exoszómák mint genetikai és epigenetikai információ-hordozók megjelenését, összetételét, szerepét is tanulmányoztuk 2016-ban. Az exoszómák kisméretű, sejtmembrán borította vezikulák, amelyeknek biológiailag aktív molekulákat szállítanak az epiteliális kompartment és a mikrokörnyezet között a tumorképződés folyamatában, ide értve a vastagbél adenoma-karcinóma szekvenciát is. Tanulmányunkban az ExoCharta adatbázis által kiválasztott top 25 exoszóma marker mRNS expressziós változásait vizsgáltuk egészséges, adenoma és vastagbél karcinómás páciensekben. A vizsgált gének közül a PGK1, a PKM, az ANXA5, az ENO1, a HSP90AB1 és az MSN szignifikáns emelkedését figyeltük meg az adenoma-karcinóma szekvencia során. Meglepő módon, a multivezikuláris-testek (MVT) és az abban elhelyezkedő exoszómák felépítésében is részt vevő ALIX (ALG 2-interacting protein X) gén expressziójának szignifikáns csökkenését figyeltük meg az ép-adenoma ( $P=5,02 \times 10^{-13}$ ) és az ép-vastagbél karcinóma ( $P=1,51 \times 10^{-10}$ ) összehasonlításban. Az ALIX fehérjeszinten szignifikáns ( $P<0,05$ ) csökkenést mutatott az adenomák és a karcinómák epiteliális kompartmentjében az egészséges mintákkal összehasonlítva. A csökkent fehérje termelés mellett a diffúz citoplazmatikus expresszió pontszerűvé alakult, ezeknek a pontoknak az átmérője 0,6 és 2  $\mu$ m közé esett, amely megegyezik a MVT-k mérettartományával. Ezek az MVT-szerű képződmények kimutathatók voltak a környező  $\alpha$ -simaizom aktin pozitív fibroblasztokban, valamint a kötőszöveti és a nyirokerekben kimutatható levált ráksejtekben. Konklúzióként elmondhatjuk, hogy az ALIX termelődése és expressziós mintázata is megváltozott az adenoma-karcinóma szekvencia során. Az emelkedett MVT és exoszóma termelés befolyásolhatja a karcinóma-kötőszövet interakciókat, így alapvetően hat a tumor növekedésre és az áttétképzésre. **(6)**

2016-os kutatásunk során a kolorektális karcinogenezis és az öregedéssel összefüggő DNS metilációs eltéréseket is vizsgáltuk a Dr. Steve Horváth által leírt epigenetikai óra DNS metilációs (CpG) helyeken. Összesen 123 vastagbél minta metilációs array adatainak *in silico* elemzésén túl az SFRP1 promóterének metilációs státuszát vizsgáltuk 8 felnőtt és 19 gyermek ép, 20 adenoma és 8 CRC szöveti mintán biszulfid-specifikus PCR-t követő metiláció-specifikus nagy felbontású olvadáspontra elemzéssel (MS-HRM). Az epigenetikai óra géneinek expresszióját is tanulmányoztuk 153 vastagbél biopsziás minta Affymetrix array adatainak felhasználásával. 15 öregedéssel összefüggő CpG hely (pl. hipermetilált SFRP1, SYNE1 és hipometilált MGP, PIPOX) mutatott DNS metilációs eltérést CRC vs. ép összehasonlításban, míg adenoma mintákban 70 CpG hely (pl. hipermetilált SDC2, SFRP1, SYNE1) metilációja tért el az ép szövethez képest ( $p<0,05$ ). Az MS-HRM elemzés az SFRP1 promóterének fokozott metilációját mutatta ki CRC-ben ( $55,0 \pm 8,4\%$ ) és adenomában ( $49,9 \pm 18,1\%$ ) ép felnőttnél ( $5,2 \pm 2,7\%$ ) és gyerek ( $2,2 \pm 0,7\%$ ) vastagbélhez képest. A felnőttek ép vastagbél szövetében az SFRP1 metiláció magasabb volt, mint gyermek ép vastagbélben ( $p<0,02$ ), ami negatívan korrelált a gyerekekben mért magasabb SFRP1 mRNS szintekkel. Számos öregedéssel összefüggő DNS metilációs eltérés a CRC kialakulása és progressziója során is tapasztalható, amely bizonyos CRC és adenoma kulcsgének expressziójára is hat. **(7)**

A 2016-os évet a gyomorrákot molekuláris szempontból bemutató összefoglaló cikkünkkel zártuk. A gyomorrák a leggyakoribb emésztő szervrendszeri daganatok közé tartozik, és bár incidenciája világszerte csökken, leggyakrabban késői stádiumban kerül felismerésre, amikor prognózisa már rossz. Az utóbbi évek kutatásai bebizonyították, hogy a betegség mind klinikailag, mind molekuláris szempontból heterogén, jól körülhatárolt molekuláris alcsoportok különíthetők el, amelyek célzott terápiával eredményesebben kezelhetők. **(8)**

A megváltozott DNS metiláció az egyik leggyakoribb epigenetikai eltérés, amely hozzájárul a daganatok kialakulásához. A szabad DNS a tumor szövettől is származhat, ezért a metilációs markerek szabad DNS-ből történő kimutatása ígéretes rákszűrő módszer lehet. 2017-ben megjelent tanulmányunkban célunk a kolorektális adenoma-karcinóma szekvencia során eltérő metilációt mutató biomarker panel kifejlesztése volt, amely szöveti és plazmamintákból egyaránt kimutatható. Kiválasztott CpG helyek metilációját elemeztük piroszekvenálással 15 ép vastagbél, 15 adenoma és 15 CRC szöveti mintában. MethyLight PCR módszerrel vizsgáltuk az SFRP1, az SFRP2, az SDC2 és a PRIMA1 gének promotereinek DNS metilációját 121 plazma és 32 biopsziás szöveti mintán. A megváltozott promóter metiláció fehérje kifejeződésre gyakorolt hatását immunhisztokémia segítségével tanulmányoztuk. Szignifikánsan magasabb DNS metilációs szinteket mértünk mind a 4 vizsgált marker promóter régiója esetén CRC és adenoma szöveti mintákban egyaránt az éphez képest ( $P < 0,05$ ). Az SFRP1, az SFRP2, az SDC2 és a PRIMA1 promóter szekvenciái a CRC-s betegek plazmamintáinak 85,1%, 72,3%, 89,4% és 80,9%-ában, az adenomás betegek vérplazmáinak 89,2%, 83,8%, 81,1%, valamint 70,3%-ában adódtak metiláltnak. A panel alkalmazásával a CRC betegek 91,5%-os szenzitivitással és 97,3%-os specificitással (görbe alatti terület (AUC)=0,978) voltak megkülönböztethetőek az ép mintáktól, míg az adenoma minták 89,2%-os szenzitivitással és 86,5%-os specificitással (AUC=0,937) bizonyultak elkülöníthetőnek. Az immunhisztokémiai elemzés csökkenő fehérjeszinteket eredményezett mind a 4 marker esetén a kolorektális adenoma-karcinóma szekvencia mentén. Eredményeink arra utalnak, hogy a fenti metilációs biomarker panel alkalmas lehet a kolorektális adenoma és karcinóma plazmamintákból történő nem-invazív kimutatására. **(9)**

A kolorektális szeszilis fogazott adenomák (SSA) feltételezhetően a kolorektális rák alternatív, fogazott útvonalon történő kialakulásának prekursor elváltozásai, amelyek számos gén promóter DNS metilációs eltéréseivel asszociálódnak. 2017-es előtanulmányunk során az SSA-ra jellemző DNA metilációs profilt és kiválasztott gének mutációinak előfordulását vizsgáltuk. A biopsziás minták vétele a vastagbélűkrözés során történt. DNS kivonást és minőségi ellenőrzést követően, 4 SSA és 5 egészséges kontroll mintát vontunk be a további vizsgálatokba. 96 kandidáns gén DNS metilációs eltéréseit vizsgáltuk q(RT)PCR módszerrel Methyl-Profiler PCR array-k alkalmazásával. 12 CRC-asszociált gén mutációs státuszát GS Junior rendszeren elemeztük bárkódokkal ellátott adapterek ligálását követően. A DNS metilációs elemzéssel 9 épben és SSA-ban egyaránt hipermetilált gént azonosítottunk. 12 gén (CALCA, DKK2, GALR2, OPCML, PCDH10, SFRP1, SFRP2, SLIT3, SST, TAC1, VIM, WIF1) fokozott metilációt mutatott az összes SSA mintában és további 2 (BNC1 és PDLIM4) a 4-ből 3 SSA-ban, míg ép mintákban a fenti gének nem metilálódtak. 2 SSA-ban BRAF mutációt és MLH1 hipermetilációt egyaránt azonosítottunk, amely minták immunhisztokémiai elemzéssel mikroszatellita instabilnak adódtak. Kombinált mutációs és DNS metilációs vizsgálatunk a rák megelőző SSA-kra jellemző DNS metilációs mintázatot eredményezett. Tanulmányunk alátámasztja, hogy a DNS metilációs eltérések potenciális biomarkerként szolgálhatnak az SSA kimutatásában, azonban ezen újonnan felismert kolorektális eltérések még teljesebb molekuláris jellemzéséhez további vizsgálatok szükségesek. **(10)**

2017-ben a DNS metilációs vizsgálataink mellett a mikroRNS-ek mint epigenetikai szabályozó molekulák vizsgálata is előtérbe került. A mikroRNS-ek fontos szerepet játszanak a kolorektális adenoma-karcinóma szekvencia során. A nagy átérésztőképességű mikroRNS array-k megjelenésével lehetővé vált a mikroRNS expressziós eltérések testfolyadékából, mint a vérplazmából történő nagy teljesítményű kimutatása is, amely mintákban a mikroRNS-ek stabilan jelen vannak. Munkánk célja keringő mikroRNS-ek azonosítása, amelyek eltérő kifejeződésűek ép colon (N), tubuláris adenoma (ADT), tubulovillózus adenoma (ADTV) és kolorektális rák (CRC) szöveti és plazma mintapárokban. 16 vérplazma és párosított biopsziás szövetmintából (N n=4; ADT n=4; ADTV n=4; CRC n=4) mikroRNS frakciót tartalmazó teljes RNS kivonást végeztünk. A plazma mikroRNS izolálás QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) segítségével történt. A párosított szövet-plazma mikroRNS vizsgálatokat GeneChip® miRNA 3.0 Array (Affymetrix) felhasználásával végeztük. Eredményeinket RT-qPCR-rel erősítettük meg (microRNA Ready-to-use PCR Human Panel I + II; Exiqon). Karakterisztikus mikroRNS expressziós eltéréseket figyeltünk meg AD és CRC plazmaminták között (miR-149\*, miR-3196, miR-4687). A N vs. CRC összehasonlításban a miR-612, a miR-1296, a miR-933, a miR-937 és a miR-1207 expresszió szignifikáns fokozódását tapasztaltuk RT-PCR módszerrel ( $P < 0,05$ ). Mikroarray technikával hasonló expressziós mintázatot mutattunk ki a szöveti mintapárok esetén is. Jóllehet a keringő mikroRNS-ek koncentrációja alacsonyabb a szövetiekénél, az expressziós mintázatok kevésbé fedtek át a szöveti és plazmaminták esetén. Az azonosított keringő mikroRNS-ek valószínűleg nemcsak a primer tumorból, hanem az immunrendszer sejtjeiből is származhatnak. **(11)**

Kapcsolódó kisebb téma keretein belül 2017-ben a sejten kívüli DNS (skDNS) beadásának hatását is vizsgáltuk a TLR9-autofágia szabályozás gyulladásos körülmények közti áthallására, amely eddig nem volt teljesen ismert. Célkitűzésünk az intravénás skDNS injektálás TLR9-mediált autofágia válasza gyakorolt immunbiológiai hatásainak vizsgálata volt, rágcsláló DSS-kolitisz modellben. Kísérletünk során DSS-kolitiszes egereknek különböző típusú módosított skDNS-eket adtunk, majd a kezelések hatására kialakult betegség előrehaladását és szövettani hatásokat, illetve lépindexet mértünk. A TLR9-hez és autofágiához kapcsolódó gének expressziós változásait qRT-PCR-rel vizsgáltuk lamina propria és lépsejtekből, amit immunhisztokémiai módszerekkel validáltunk. A vastagbél ultrastrukturális változásait transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgáltuk. Eredményeink szerint, már egyszeri intravénás kolitisz skDNS (C-DNS) beadás is kedvező klinikai és szövettani hatásokat eredményezett a DSS-kolitiszes állatokban, összehasonlítva a normál skDNS-t (N-DNS) kapott állatok értékeivel. A C-DNS-beadás erősebb hatást gyakorolt a TLR9-autofágia válasz kimenetelére, mint a N-DNS. A C-DNS csökkentette a lépindexet DSS-kolitiszes egerekben. Normál egerek C-DNS-kezelése a Beclin1 és az ATG16L1 mRNS és a fehérje expressziójának csökkenését eredményezte a vastagbélben. A fentiek mellett a LC3B is alacsony kifejeződést mutatott a lépben. Ezzel szemben C-DNS beadása a Beclin1, az ATG16L1 és a LC3B gén és fehérje expresszióját mind a vastagbélben, mind a lépben fokozta. Ezen kívül a C-DNS-beadása jelentősen megnövelte a DSS-kolitiszes egerek hámsajtjeiben az autofágiás vakuólumok számát, ami fokozott makroautofágiára utal. Az intravénás beadott skDNS TLR9-mediált autofágia válasza gyakorolt hatása kifejezetten függ az skDNS eredetétől és a helyi immunbiológiai milió jellemzőitől (gyulladásos vagy sem). **(12)**

2017-es összefoglaló cikkünkben IGF/IGF1R rendszer és az autofágia kapcsolatát mutattuk be colitis-ben és CRC-ben. A metabolikus szindróma (MetS), mint krónikus gyulladásos megbetegedés potenciális szerepet játszik a vastagbélgyulladásos és rákos folyamatainak kialakulásában. A DNS károsodásának és gyulladásának kölcsönhatását az inzulinszerű növekedési faktor 1 receptor (IGF1R) jelátviteli útvonal befolyásolja. Az IGF1R útvonal többek közt szabályozza az autofágiát, de néha kétirányú kontextuson keresztül. Az IGF1R-autofágia áthallásának terápiás célzása ígéretes stratégiát jelenthet az új gyulladáscsökkentő és daganatellenes terápiák kifejlesztéséhez, és segíthet azoknak a betegeknek, akik MetS-ban szenvednek, és fokozott rizikójuk van vastagbélrák kialakulására. A célzott terápiákra adott terápiás válaszok azonban gyakran rövidek, mivel az IGF1R és más receptor tirozin-kinázok vagy autofágia jelátviteli utak közt áthallás lehetséges, ami a terápia szerzett sejtes rezisztenciáját eredményezi. Farmakológiai szempontból vonzó azt feltételezni, hogy az IGF1R útvonal egyik kulcsfontosságú effektorának gátlásával szinergikus előnyök érhetők el, az autofágia rendszer farmakológiai stimulálásával párhuzamosan, de a fentieket óvatosan kell kezelni, mivel az IGF1R farmakológiai modulációja további, esetenként kedvezőtlen biológiai hatásokat indíthat el. **(13)**

Napjainkban a genetikai kutatások mellett egyre inkább előtérbe kerülnek az epigenetikai vizsgálatok, ugyanis az epigenetikai jelenségek – köztük a DNS-metiláció is – részt vesznek a fenotípust meghatározó gének expressziójának szabályozásában, így számos betegség mechanizmusával összefüggnek. 2018-as összefoglaló közleményünkben a DNS-metiláció evolúció során történő megjelenését, funkcióit, és az öregedésben és a rákos megbetegedésekben betöltött szerepét mutattuk be. A DNS-metiláció a prokarióták és vírusok esetén idegen DNS-sel szembeni védelmi funkciót lát el. A DNS-metiláció prokariótáknál jelentős szereppel bír a transzkripció regulációjában, a replikáció iniciációjában, illetve a Dam-irányított hibajavításban. A vírusoknál a védelmi funkció mellett a terjedésükhöz szükséges kapszid formálásában is részt vesz. Az eukarióták esetén a DNS-metiláció szerepet játszik a kromatinsztruktúra és a transzkripció szabályozásában, a rekombinációban, a replikációban, az X-kromoszóma inaktivációjában, a transzpozonok szabályozásában és az imprinting létrehozásában. Az öregedés során és a rákos megbetegedésekben kialakuló globális hipometilációs eltérések genetikai instabilitáshoz és spontán mutációs eltérésekhez vezethetnek a transzpozonok szabályozásában betöltött funkciójuk révén. A lokális hipermetilációs változásoknak a fehérje expressziós változások létrehozásában, ezáltal a rák fenotípus kialakulásában van jelentős szerepe. **(14)**

A CRC kifejlődése során tumor eredetű szabad DNS kerül a keringésbe. Kivonására, tárolására számos izolációs technika és speciális, a DNS-t stabilizáló gyűjtőcső létezik, melyek nagymértékben befolyásolhatják a további folyadék biopszia elemzést. 2018-as tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy a fenti tényezők miként hatnak a szabad DNS mennyiségére és négy, CRC-ben fokozott metilációt mutató biomarker promóterének metilációs szintjére. Három kézi (High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit; Epi proColon 2.0 Kit; Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit) és két automatizált izoláló módszert (InviGenius and InviGenius PLUS) hasonlítottunk össze, kétféle gyűjtőcső (K3EDTA és Streck Cell-Free DNA BCT®) alkalmazása mellett. A szabad DNS kivonását és biszulfid konverzióját követően az SFRP1, az SFRP2, az SDC2 és a PRIMA1 metilációs szintjét MethylLight assay-vel mértük. Az InviGenius rendszer használata magasabb, míg az InviGenius PLUS alacsonyabb szabad DNS kihozatalt eredményezett a manuális oszlopos technikákhoz képest. A különböző gyűjtőcsövek alkalmazása nem okozott szignifikáns szabad DNS kihozatal eltérést. A metilációs szintek és gyakoriságok tekintetében a kézi izolációs módszerek hoztak megbízhatóbb eredményeket. A nagy teljesítményű, felhasználóbarát automatizált rendszerek izolációs protokolljainak további fejlesztésével növelhetővé válhat a további metilációs elemzések szenzitivitása. **(15)**

A sejten kívüli szabad DNS a tumoros sejtekből, valamint ezzel párhuzamosan az egészséges sejtekből is felszabadul. 2018-ban megjelent munkánk célja a szabad DNS felszabadulási ütemének vizsgálata volt SHO-egér/HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal xenograft modellben, valamint célul tűztük ki egészséges és C38 tumorral oltott C57BL/6-os egerek véráramába juttatott mesterségesen felszaporított metilált és nem metilált DNS-szakaszok lebomlásának nyomon követését. Eredményeink szerint a tumorból származó humán DNS mennyisége a 2. hétig a kimutathatósági határ alatt volt, majd a 3. héttől folyamatos emelkedést tapasztaltunk, amely a 8. hétre 18,26%-ot ért el. A véráramba juttatott DNS-szakaszok lebomlásának sebességében különbséget mutattunk ki a nem metilált és a metilált fragmentumok között. Az egészséges állatokban a nem metilált DNS 6 óra után eltűnt a vérplazmából, míg a metilált fragmentumok 24 óra múlva is kimutathatók voltak. Tumoros állatokban a degradáció mértéke lelassult, és mindkét forma kimutathatóvá vált 24 óra elteltével. Munkánk segítséget nyújthat a DNS felszabadulásának és degradációjának pontosabb megismeréséhez. **(16)**

A növekedéssel összefüggő gének DNS mutációs elváltozásai random módon történnek, elsősorban citozinokon. A citozinok demetilációja – spontán deamináció útján – genetikai instabilitáshoz vezethet. 2018-ban publikált tanulmányunk célkitűzése a teljes genom DNS metilációs vizsgálat mellett vastagbélrák-asszociált gének (APC, BRAF, CTNNB1, EGFR, FBXW7, KRAS, NRAS, MSH6, PIK3CA, SMAD2, SMAD4, TP53) célzott mutációs elemzése, valamint a TP53 útvonal génjeinek expressziós analízise volt. Fokozódó globális DNS hipometilációt tapasztaltunk a kolorektális ép-adenoma-karcinóma szekvencia előrehaladása során LINE-1 biszulfid-specifikus PCR-t követő piroszekvenálással. 6 ép területről vett (NAT), 15 adenomás (AD) és 9 CRC szöveti minta methyl capture szekvenálásával a top50 hiper/hipometilált régiót (DMR-t) határoztuk meg. Az AD-NAT összehasonlításban – többek között - a TP73, az NGFR és PDGFRA gének fokozott metilációját, míg az FMN1 és az SLC16A7 gének csökkent metilációját mutattuk ki. CRC-ben a DKK2, az SDC2 és a SOX1 gének hipermetilálódtak, míg az ERBB4, a CREB5 és a CNTN1 gének metilációs szintje csökkent. Bizonyos mutációs forrópont régiókban DNS metilációs eltéréseket is észleltünk. Az APC, a TP53 és a KRAS mutációk az AD-k 30%, 15% és 21%-ában, illetve a CRC minták 29%, 53% és 29%-ában voltak kimutathatók. A TP53 útvonalbeli gének promóterében történt metilációs változások gyakran az mRNS kifejeződés eltéréseiben is megnyilvánultak. **(17)**

2018-ban felkérésre írt összefoglaló cikkünkben a kétirányú exoszomális transzport áttétképzés során betöltött szerepét taglaltuk. A karcinómák komplex struktúrák, amelyek hierarchikus sejtpopulációkból állnak, mint a rák-össejtek és a nem össejt tulajdonságú, tumor masszát felépítő sejtek. A ráksejtek genetikai és epigenetikai tulajdonságai, valamint kapcsolatok a mikro környezetük fibroblaszt sejtjeivel fontos meghatározói lehetnek a rák inváziós képességének. A ráksejt-fibroblaszt információáramlás fontos résztvevői a membrán borította extracelluláris vezikulumok, köztük az exoszómák. Mind a tumor, mind a fibroblaszt eredetű exoszómák szabályozómolekulák - például fehérjék és különböző típusú RNS molekulák - széles skáláját hordozzák, amelyek kollektíven segítik az áttétképzést. Tanulmányunkban összefoglaljuk a lehetséges exoszóma-alapú kapcsolatokat a rák-össejtek és fibroblaszt sejtek között, kitérve kitüntetett szerepükre az emlő tumorok növekedésében és az áttétképzésben. **(18)**

A TLR9 jelátvitel és az autofágia közötti kapcsolat immunbiológiai következményeit kevésbé vizsgálták HT29 sejtekben. Módosított saját DNS TLR9-közvetített sejtkenetika és autofágia válaszbeli hatásának tanulmányozása céljából 2018-as tanulmányunkban HT29 sejteket intakt genomialis (g), hipermetilált (m), fragmentált (f), illetve hipermetilált/fragmentált (m/f) saját DNS-sel kezeltünk és megfigyeltük a sejt életképességet, az apoptózist, a sejtproliferációt, valamint a „colonosphere” képzést. A TLR9 jelátvitel és az autofágia válasz közötti kapcsolatot valós idejű PCR, immuncitokémia és transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM) segítségével vizsgáltuk. A g-, m- és m/f-DNS kezelés csökkentette a sejtek életképességét és proliferációját, fokozta az apoptózist, míg a f-DNS növelte a sejtek túlélését. A saját DNS metilációja csökkentette a TLR9 expresszióját, míg nem befolyásolta a DNS fragmentáció MyD88 és TRAF6 expressziót fokozó és TNF $\alpha$  kifejeződést csökkentő hatását. A DNS fragmentáció megszüntette a metiláció IRAK2, NF $\kappa$ B és IL-8 kifejeződést fokozó hatását. Az autofágia gének közül a g- és f-DNS szignifikáns Beclin1, Atg16L1 és LC3B mRNS és fehérje expresszió növekedést okozott. A TEM elemzés alapján, autofágia minden tumorsejt-csoportban jelen volt, de különböző mértékben. A metilált DNS kezelés visszavetette a sejt túlélést az apoptózisra és aktivált mitofágiára jellemző tulajdonságok előidézésével. A f-DNS növelte a sejtek túlélését, valamint makroautofágiát és lipofágiát indukált. Colonosphere-ek csak az m-DNS kezelés hatására képződtek. Eredményeink a TLR9 jelátvitel és az autofágia válasz közötti kapcsolatra utalnak, amely jelentősen befolyásolja a módosított saját DNS kezelésnek alávetett HT29 sejtek túlélését. **(19)**

### 2015.

- 1., 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;10:e0133836. **IF:3,057**
- 2., 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;15:736. **IF:3,265**
- 3., Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Wichmann B, Bodor A, Patai ÁV, Schöller A, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Bisulfite-based DNA methylation analysis from recent and archived formalin-fixed, paraffin embedded colorectal tissue samples. *Pathol Oncol Res*. 2015;21:1149-56. **IF:1,940**

### 2016.

- 4., Tóth K, Barták BK, Tulassay Z, Molnár B. Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16:239-52. **IF: 3,100**
- 5., 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;11:588-602. **IF: 4,394**
- 6., 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;29:928-38. **IF: 5,728**
- 7., Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Patai ÁV, Leiszter K, Péterfia B, Wichmann B, Valcz G, Veres G, Tulassay Z, Molnár B. Aging related methylation influences the gene expression of key control genes in colorectal cancer and adenoma linked. *World J Gastroenterol*, 2016;22:10325-40. **IF: 3,365**
- 8., Patai ÁV, Molnár Cs, Csóka C, Micsik T, Hajdu-Andersson I, Farkas P, Herszényi I, Tulassay Zs. Gyomorrák genetikája és molekuláris altípusainak jelentősége. *Magy Beolv Arch*, 2016; 69: 5-8.

### 2017.

- 9., 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;12:751-63. **IF: 4,918**
- 10., Patai ÁV, Barták BK, Péterfia B, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, Péter Z, Patai Á, Valcz G, Kalmár A, Tóth K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Comprehensive DNA methylation and mutation analyses reveal a methylation signature in colorectal sessile serrated adenomas. *Pathol Oncol Res*. 2017;23:589-94. **IF: 1,935**
- 11., Nagy ZB, Barták BK, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Dank M, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. Comparison of circulating miRNAs expression alterations in matched tissue and plasma samples during colorectal cancer progression. *Pathol Oncol Res*. 2019;25:97-105. Epub 2017 Oct 4. **IF: 1,935**
- 12., Múzes G, Kiss AL, Tulassay Z, Sipos F. Cell-free DNA-induced alteration of autophagy response and TLR9-signaling: Their relation to amelioration of DSS-colitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017;52:48-57. **IF: 1,920**
- 13., Sipos F, Székely H, Kis ID, Tulassay Z, Múzes G. Relation of the IGF/IGF1R system to autophagy in colitis and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23:8109-19. **IF: 3,300**

### 2018.

- 14., Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. [Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer]. *Orv Hetil*. 2018;159:3-15. **IF(2017): 0,322**
- 15., 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*. 2018 (nyomtatásban). **IF(2017):1,935**
- 16., Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. [In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation]. *Orv Hetil*. 2018;159:223-33. **IF(2017):0,322**
- 17., 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;18:695. **IF(2017): 3,288**
- 18., Valcz G, Buzás EI, Szállási Z, Kalmár A, Krenács T, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. Perspective: bidirectional exosomal transport between cancer stem cells and their fibroblast-rich microenvironment during metastasis formation. *NPJ Breast Cancer*. 2018;4:18. (frissen indult szakfolyóirat, várhatóan IF: 6)
- 19., Sipos F, Kiss AL, Constantinovits M, Tulassay Z, Múzes G. Modified genomic self-DNA influences in vitro survival of HT29 tumor cells via TLR9- and autophagy signaling. *Pathol Oncol Res*. 2018 (nyomtatásban). **IF(2017):1,935**