

A vastagbél-daganatok kialakulása során megváltozó expressziójú gének és szabályozó folyamataik vizsgálata

Doktori értekezés

Kalmár Alexandra

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Programvezető: Prof. Dr. Tulassay Zsolt, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Ponyi Tamás, Ph.D., tudományos és applikációs munkatárs

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

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
2	BEVEZETÉS.....	6
2.1	A vastagbél szövettani szerkezete	6
2.2	Vastagbél-daganatok (CRC).....	7
2.2.1	A vastagbél-daganatok epidemiológiája.....	7
2.2.2	A vastagbél-daganatok kialakulása.....	8
2.2.3	A vastagbél-daganatok diagnózisa, klinikai stádiumbesorolása.....	14
2.2.4	A vastagbél-daganatok szűrő módszerei.....	16
2.2.5	A vastagbél-daganatok molekuláris markerei.....	17
2.3	Szöveti minták expressziós és epigenetikai eltéréseinek vizsgálatára alkalmazott molekuláris biológiai módszerek.....	25
2.3.1	Szövetminták típusai és vizsgálati lehetőségeik.....	25
2.3.2	Génexpressziós vizsgálatok.....	27
2.3.3	DNS metilációs vizsgálatok.....	29
2.3.4	Fehérjék kimutatása.....	34
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	36
4	MINTÁK ÉS MÓDSZEREK.....	37
4.1	A vizsgált szövetminták.....	37
4.1.1	A vizsgált szövetminták összefoglalása.....	37
4.1.2	A vizsgált szövetminták feldolgozása.....	38
4.2	Vastagbélrákra jellemző mRNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon.....	39
4.2.1	Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.....	39
4.2.2	Vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon.....	40
4.3	DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetminták vizsgálata során.....	45
4.3.1	Automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.....	45
4.3.2	Markerek kiválasztása DNS metilációs vizsgálatokra.....	48
4.4	A <i>SEPT9</i> gén DNS metilációs vizsgálata lézer mikrodisszektált hám és stromális sejtekben.....	55
4.4.1	Mintagyűjtés.....	55
4.4.2	Lézer mikrodisszekció.....	56
4.4.3	Lézer mikrodisszektált sejtek előkezelése.....	57
4.4.4	DNS metilációs vizsgálat.....	57
4.4.5	Immunhisztokémiai vizsgálat.....	60
5	EREDMÉNYEK.....	61
5.1	A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon.....	61
5.1.1	Automatizált RNS izolálás alkalmazásának vizsgálata.....	61
5.1.2	A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon.....	63
5.2	DNS metilációs markerek vizsgálata vastagbél-daganatokban.....	69
5.2.1	Automatizált DNS izolálás alkalmazásának vizsgálata DNS metilációs elemzés során.....	69
5.2.2	DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákban.....	76
5.3	A <i>SEPT9</i> gén DNS metilációs vizsgálata lézer mikrodisszektált hám és stromális sejtekben.....	86
5.3.1	DNS metilációs standard minták vizsgálata.....	86
5.3.2	A <i>SEPT9</i> gén DNS metilációs szintje.....	87

5.3.3	Septin 9 immunhisztokémia	90
6	MEGBESZÉLÉS	91
6.1	A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopszia és FFPE mintákon.....	92
6.1.1	Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata	92
6.1.2	Vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon	93
6.2	DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákból.....	98
6.2.1	Automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.....	98
6.2.2	Markerek kiválasztása DNS metilációs vizsgálatokra.....	100
6.3	A SEPT9 gén DNS metilációs szintje vastagbél szövetben	103
6.4	Az aberráns DNS metiláció okai és következményei.....	106
7	KÖVETKEZTETÉSEK	109
8	LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK.....	110
9	ÖSSZEFOGLALÁS	111
9.1	Magyar összefoglaló.....	111
9.2	Angol összefoglaló	112
10	IRODALOMJEGYZÉK	113
11	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	130
11.1	A disszertáció témájában megjelent közlemények	130
11.1.1	Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	130
11.1.2	Magyar folyóiratban megjelent közlemények	131
11.2.	A disszertáció témájától eltérő témában megjelent közlemények.....	132
11.2.1	Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	132
11.2.2	Magyar folyóiratban megjelent közlemények	132
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	133

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-Aza - 5-aza-2'-deoxicitidin

5-FU - 5-fluorouracil

ACTB - béta aktin gén

AD - adenoma

ADP - adenzin-difoszfát

ATP - adenzin-trifoszfát

APC - adenomatous polyposis coli gén

bcDNA - biszulfít konvertált DNS

BCIP - 5-bróm-4-kloro-3'-indolil-foszfát

BRAF - B-Raf gén

BS-PCR - biszulfít-szekvenáló polimeráz láncreakció

CA7 - karbon anhidráz gén (Carbonic anhydrase VII)

CCD - töltéscsatolt készülék (Charge-coupled device)

cDNS - komplementer DNS

CGI - CpG sziget (CpG island)

CHI3L1 - kitináz 3-szerű 1 gén (Chitinase 3-like 1)

CIMP - CpG szigeteket érintő regionális hipermetiláció

CIN - kromoszomális instabilitás

COL12A1 - kollagén XII, alfa 1 gén

COX-2 - ciklooxygenáz-2 gén

Cp - áttörési pont (crossing point)

CpG - C-G dinukleotid

CpG-sziget - CG dinukleotidban gazdag szekvenciaregión

CRC - vastagbél-daganat (colorectal cancer)

CXCL1 - kemokin (C-X-C motívum) ligand 1

CXCL2 - kemokin (C-X-C motívum) ligand 2

DAB - diaminobenzidin

DNS - dezoxiribonukleinsav

DNMT - DNS metiltranszferáz

ELISA - enzim kapcsolt immunabszorpciós vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)

emPCR - emulziós polimeráz láncreakció

EtOH - etanol

GAPDH - gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

GEO - Gene Expression Omnibus adatbázis

GREM1 - gremlin 1 gén

HRP - tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)

FAM - 6-karboxi-fluorescein

FAP - familiáris adenomatosus polyposis

FFPE - formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövet

FIT - immunalapú széklet vértartalom meghatározás (Fecal Immunochemical Test)

FOBT - széklet vértartalom meghatározás (Fecal Occult Blood test)

HNPCC - hereditér nem-poliposis kolorektális karcinoma

IL1B - interleukin 1 béta gén

IL1RN - interleukin 1 receptor antagonist gén

IL8 - interleukin 8 gén

IVT - in vitro transzkripció

K-ras - Kirsten rat sarcoma gén

LNA - lakatolt nukleinsav (Locked Nucleic Acid)

lncRNS – hosszú nem-kódoló RNS (long non-coding RNA)

LCM - lézer mikrodisszekció (Laser Captured Microdissection)

MBD1 - metil-CpG-kötő domain fehérje 1 (methyl CpG-binding domain protein 1)

MeDIP - metilált DNS immunprecipitáció

MeCP2 - metil-CpG-kötő fehérje (methyl CpG binding protein 2)

MgCl₂ - magnézium-klorid

miRNS - mikroRNS

MMP3 - mátrix metallopeptidáz 3 gén

MMR - DNS hibajavító rendszer (mismatch repair)

MS-HRM - metiláció-specifikus olvadáspont elemzés (MS-High Resolution Melting)

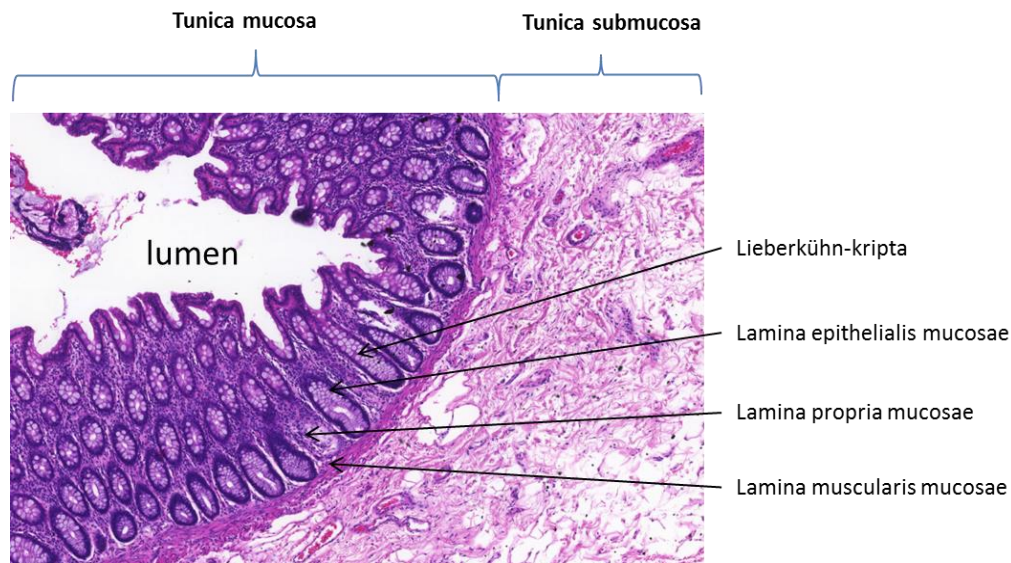
MSI - mikroszatellita instabilitás

MSP - metiláció specifikus polimeráz láncreakció
MSS – mikroszatellita stabilitás
NAT - tumor melletti ép szövet (normal tissue adjacent to tumor)
NaOH - nátrium-hidroxid
NBT - 4-nitro-blue tetrazolium
OCT - fagyasztott beágyazó anyag (Optimum Cutting Temperature)
p21WAF1 - ciklin-függő kináz inhibitor 1
PAM - Prediction Analysis for Microarrays statisztikai elemző módszer
PCNA - proliferating cell nuclear antigen
PBS - foszfát puffer (Phosphate Buffer Saline)
PCR - polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
PPi - pirofoszfát
RIN - RNS integritási szám (RNA Integrity Number)
RN18S1 - 18S riboszomális RNS
RNS - ribonukleinsav
ROC - Receiver Operating Characteristic görbe
rpm – percenkénti fordulatszám (round per minute)
RT-PCR - valós idejű polimeráz láncreakció (Real-Time PCR)
SAM - Significance Analysis of Microarray statisztikai elemző módszer
SAM - S-adenozil-metionin
SLC7A5 - SLC 7 géncsalád 5. tagja (Solute carrier family 7, member 5)
Tm - olvadáspont (melting temperature)
TMA - szöveti microarray módszer (Tissue Microarray)
TNM - daganat stádium beosztás
UC - colitis ulcerosa

2 BEVEZETÉS

2.1 A vastagbél szövettani szerkezete

A vastagbél feladata a víz és ásványi sók felszívása a bélcsatornából és az emészthetetlen salakanyag külvilágra juttatása. A humán vastagbél hossza megközelítőleg 1,5 m, a bélcsatorna átmérője átlagosan 6-8 cm. A vastagbél vakbélre (coecum), felszálló (colon ascendens), haránt (colon transversum) és leszálló (colon descendens) vastagbéltre, szigma-bélre (colon sigmideum) és végbélre (rectum) osztható [1]. A vastagbélfal három szövettani rétegre különíthető el, ezek a bél lumene felől haladva: 1. tunica mucosa (nyálkahártya), amely tovább bontható a lamina epithelialis mucosa (hámréteg), lamina propria mucosae (kötőszövetes réteg) és a lamina muscularis mucosae (mirigyekhez tartozó izomszövet) rétegekre, 2. tunica submucosa (mucosa alatti kötőszövetes réteg) és a 3. tunica muscularis (a bélcső körkörös és hosszanti izomrétege) [1]. Az egészséges vastagbéltre jellemző, hogy nyálkahártya hámrétege kesztyűujj-szerűen a bél falába, a lamina propria mucosae rétegbe tűródik, az így létrejövő mélyedést Lieberkühn-kriptáknak nevezzük. A bél kötőszövetes rétege laza rostos kötőszövet, amelyet a kripták körül fibroblaszt/miofibroblaszt sejtek, továbbá immunsejtek (granulociták, makrofágok, B- és T- limfociták) alkotnak. A bél hámrétegét a kriptákon belül bazálisan elhelyezkedő osztódó őssejtek alakítják ki, amelyek differenciálódásukkal párhuzamosan a kripták lumináris felszíne felé vándorolnak, ahol érett abszorpciós hengerhámsejtekké és nyáktermelő kehelysejtekké differenciálódnak, majd átlagosan 5-6 nap múlva leválnak. A sejtosztódás és a migráció egészséges állapotban dinamikus egyensúlyban van a nyálkahártya felületéről leváló és elhaló sejtek mennyiségével. Azonban ha ez az egyensúly a sejtosztódás felé eltolódik, úgy lokális sejtszaporulatok, kitüremkedések, más néven polipok képződnek. Az így kialakult polipok a daganatképződés kiindulási állapotai lehetnek [2].

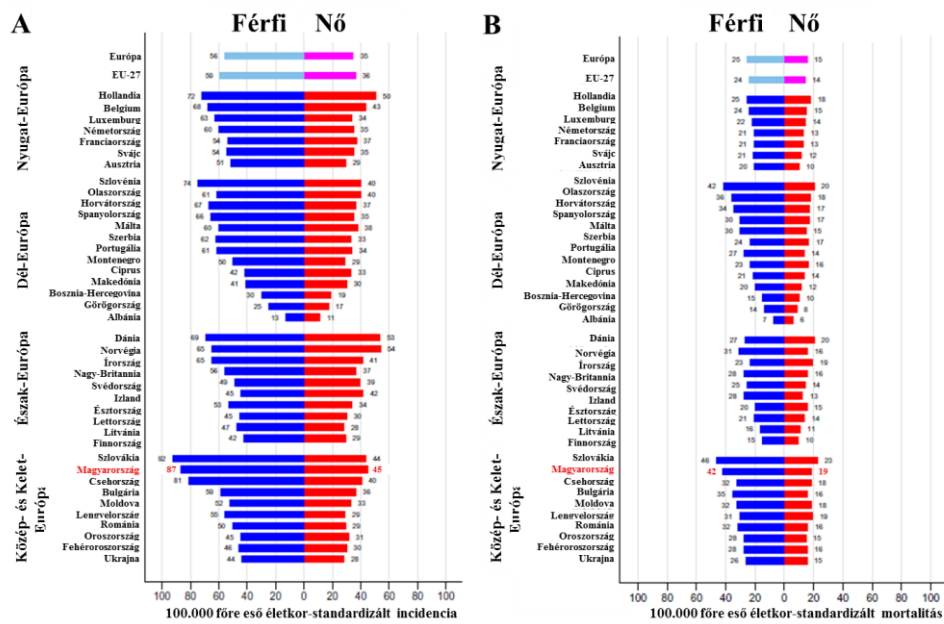


1. ábra: A vastagbél szövettani szerkezete

2.2 Vastagbél-daganatok (CRC)

2.2.1 A vastagbél-daganatok epidemiológiája

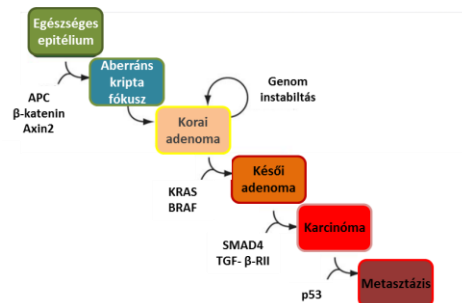
Magyarország világviszonylatban vezető az újonnan felfedezett daganatos megbetegedések és a daganatos halálozás számát tekintve. Európában a daganatos megbetegedések számát tekintve a magyar férfiak az első, a magyar nők a második helyen állnak. [3, 4]. Egy 2012-ben készült felmérés szerint a gasztrointesztinális daganatok előfordulása Európában eltérő területi megoszlást mutat, például a vastagbél-daganat gyakorisága a balkáni országokban viszonylag alacsony (pl. Albániában 100.000 főre vetítve 13 férfi és 11 nő), míg a közép európai országokban, hazánkkal az élen relatív magas előfordulási arány tapasztalható (Magyarországon 100.000 főre vetítve 87 férfi és 45 nő) (2. ábra). A magyar populációban, férfiakban és nőkben egyaránt a tüdőrák után a vastagbél-daganat a leggyakoribb daganatos megbetegedés [3]. Hazánkban az újonnan felismert vastagbél-daganatok száma és a mortalitás egyaránt növekvő tendenciát mutat. 2001-ben a magyar lakosság körében 7600 vastagbél-daganatos esetet diagnosztizáltak és 4910 haláleset történt, 2010-ben már az újonnan diagnosztizált CRC-k száma 9000 nőtt és 5000 halálesetet regisztráltak [5, 6].



2. ábra: A vastagbél-daganatok incidenciája (A) és mortalitása (B) a 2012. évi európai felmérés adatai alapján. Az ábra Ferlay és munkatársai alapján, módosítva készült [3].

2.2.2 A vastagbél-daganatok kialakulása

A vastagbél-daganatok kialakulása az egészséges vastagbélhamban végbemenő, folyamatosan felhalmozódó molekuláris változások indukálta folyamat, amely intenzív kutatás tárgya. A klasszikus, Fearon és Vogelstein által 1990-ben leírt modell szerint az ép vastagbélhamból kiindulva mutációk és egyéb molekuláris változások következtében korai, majd késői adenoma rákmegelőző állapotokon át a daganat végül adenokarcinómává alakul [7] (3. ábra).



3. ábra: Vogelstein modell. Az ábra Mudassar és munkatársai alapján, módosítva készült [8]

Az eredeti modell számos további tanulmánynak adott alapot, és időközben a Vogelstein-modellről alkotott elképzelés is formálódott. Az egyik módosítás, hogy a vastagbél adenokarcinoma nem csak a tubuláris és a tubulovillózus polipokból, hanem egyéb rákmegelőző állapotokból (pl. szesszilis fogazott polipokból) is kifejlődhet [9]. A vastagbélhám normális homeosztázisát és a megújuló hám sejtosztódási folyamatait különböző genetikai és az epigenetikai folyamatok szigorúan kontrollált folyamata tartja fent. A szabályozási folyamatok megváltozása ennek értelmében jelentős változást tud előidézni, amely a kontrollálatlan sejtosztódás és a sejthalál zavarai miatt kóros sejtszaporulatot eredményez. A vastagbél daganat kialakulását különböző molekuláris változások okozhatják, ezek alapján különböző tumorképződés felé vezető genetikai és epigenetikai instabilitással rendelkező állapotokat különböztetünk meg: előbbi kategóriában a kromoszóma instabilitást (CIN) és a mikroszatellita instabilitást (MSI), utóbbiban a DNS metilációs szabályozó rendszer hibáit.

2.2.2.1 Genetikai instabilitás

2.2.2.1.1 Kromoszóma instabilitás (CIN)

A kromoszóma instabil daganattípusokra jellemző, hogy sejtjei a normálistól eltérő kromoszómakészlettel rendelkeznek (aneuploidia), a tumoros sejtek gyakran megsokszorozódott kromoszóma szerelvényt hordoznak (poliploidia). A megszűnő vagy többszörösen jelenlévő kromoszómaszakaszok genomi instabilitást eredményeznek, bizonyos gének alul- illetve felülregulálódását okozzák. A tumorszuppresszor gének közül az *APC*, a *p53* és a *SMAD4* gének elvesztését is gyakran ez a folyamat okozza [10]. Az *APC* gén mutációja vastagbél daganatokban a leggyakrabban kimutatható mutáció. Az *APC* fehérje egészséges sejtekben a β -katenin és a GSK-3 β fehérjével képez komplexet, amely a β -katenin degradációjához vezet. Az *APC* fehérje hiányával a β -katenin fehérje negatív regulációja megszűnik, a sejtosztódást szabályozó Wnt útvonal kontrollálatlanul működhet. Ezáltal a β -katenin fehérje mennyisége megnő, majd a sejtmagba transzlokálódik és olyan gének transzkripcióját indukálja, amelyek az angiogenezist (pl. *VEGF*) és a sejtproliferációt (pl. ciklin-D) serkentik [11]. A gén csírasejtes mutációja a familiáris adenomatózus polipózus (FAP) szindrómát okozza, az érintett betegeknél életük során több száz polip megjelenése jellemző [12]. A *p53* apoptózisban szerepet játszó gén leggyakrabban egy

misszensz mutációt követő kromoszóma delécióval inaktiválódik [13]. A *SMAD4* és a *TGFBR2* mutációja egyaránt a TGF- β útvonal inaktivációját okozzák, amely a CRC kialakulása során jellemzően az adenoma – high grade dysplasia átalakulással párhuzamos változás [14]. A *DCC* (deleted in colorectal cancer) gén a 18. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, elnevezése arra utal, hogy vastagbél-daganatokban gyakran delécióval inaktiválódik, ami a sejthalál folyamatában idéz elő rendellenességeket [15].

A Vogelstein modellt az a megfigyelés is alátámasztja, amely szerint a fent említett változások a rákmegelőző adenomákban is jellemzőek. A kromoszóma instabilitás molekuláris hátterében álló mechanizmus lehet az onkogén külső tényezők által okozott stressz, a DNS teloméra rövidülés és a daganatok kialakulása során jellemző globális DNS hipometiláció is [16, 17]. A vastagbél-daganatok 85%-a ebbe a kategóriába sorolható [18].

2.2.2.1.2 Mikroszatellita instabilitás (MSI)

A második molekuláris típusba, az ún. mikroszatellita instabil daganatok (MSI) csoportjába a CRC esetek megközelítőleg 15%-a tartozik. A csoport onnan kapta nevét, hogy az ún. mismatch repair (MMR) hibajavító enzimrendszer (pl. MLH1, MSH2 enzimek) eltérései miatt a genomban található rövid ismétlődő szakaszok, az ún. mikroszatelliták száma megváltozik. Az MMR rendszer tagjai olyan hibajavító enzimek, amelyek felismerik és javítják a DNS replikáció vagy rekombináció során létrejött inszerciákat, deléciókat és hibásan beépült bázisokat.

Az MMR rendszer öröklött inaktivációja a hereditár vastagbél-daganatok leggyakoribb fajtáját, az ún. Lynch szindrómát (HNPCC) eredményezi [19], amelyben leggyakrabban az *MLH1* (50% gyakoriság), az *MSH2* (40% gyakoriság) és az *MSH6* (10% gyakoriság) gének mutációi jellemzőek [20]. Az általánosan használt 5 mikroszatellita marker, amely alapján a diagnózist felállítják a BAT25, a BAT26 mononukleotidok és a D5S346, a D2S123 és a D17S250 dinukleotidok. Ezek alapján megkülönböztetünk mikroszatellita stabil (MSS) és mikroszatellita instabil (MSI) CRC eseteket, az utóbbi kategóriát tovább bontva az ún. magas instabilitással (MSI-H, vizsgált markerek több, mint 30%-a mutat instabilitást) és az alacsony instabilitással (MSI-L, a vizsgált markerek kevesebb mint 30%-a mutat instabilitást) rendelkező

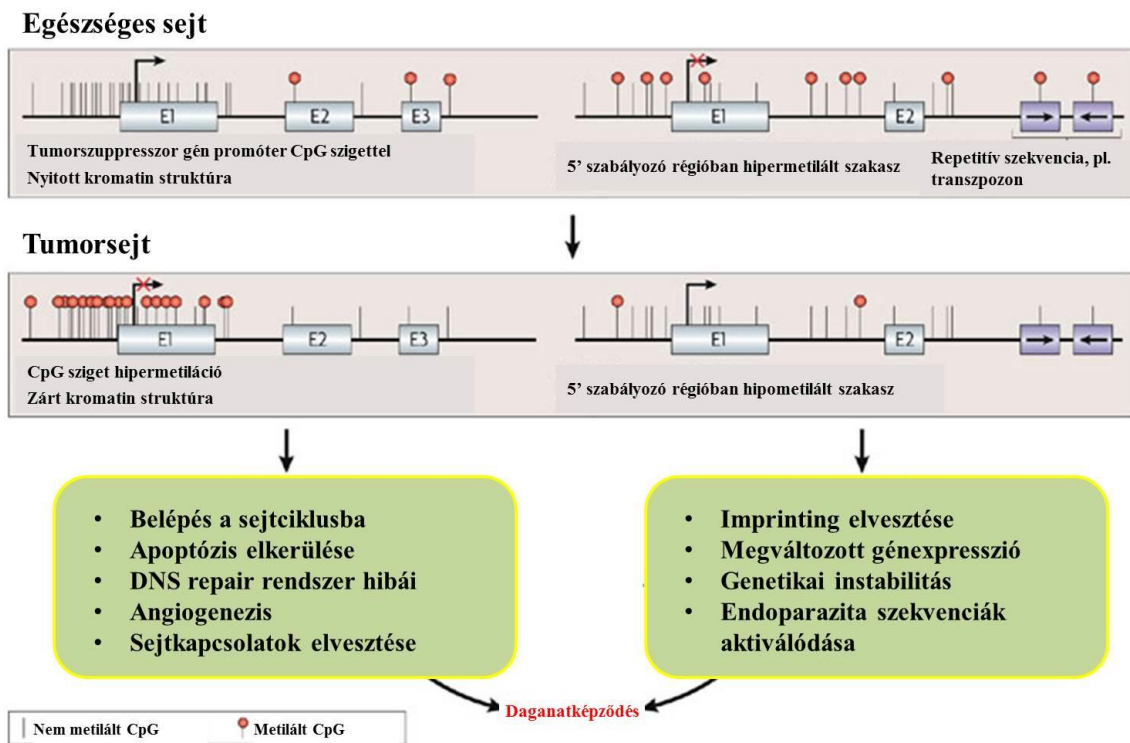
daganatokat. Az MSI-H daganatokban leggyakrabban az *MLH1* gén mutációja vagy promóter hipermetilációja illetve az *MSH2* gén mutációja jellemző [21].

A daganatfejlődési utak különbségére hívja fel a figyelmet az a jelenség, hogy ha egy daganat kromoszóma instabilitást mutat, akkor mikroszatellita instabil, és vice versa [22]. A betegek túlélése szempontjából a mikroszatellita instabil daganatok jobb prognózisúnak tekinthetők, mint a kromoszóma instabil CRC esetek [23]. A mikroszatellita instabilitás kialakulásának háttere jól ismert, az MMR gének inaktiválódásával jön létre, amely történhet mutációval vagy DNS metilációval is (pl. *MLH1* hipermetiláció) [24].

2.2.2.2 Epigenetikai instabilitás

2.2.1.2.1 DNS metiláció

A DNS metiláció egy olyan DNS-t érintő öröklődő módosítás, mely során a citozin pirimidin gyűrűjének 5-ös pozíciójában lévő szénatomhoz metilcsoport kapcsolódik, míg maga a nukleotid szekvencia változatlan marad. A folyamatot a DNS-metiltransferáz családba tartozó enzimek (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) S-adenozil-metionin (SAM) metil-donor jelenlétében katalizálják [25]. A metiláció célpontjai a genomban elszórtan, illetve néhány régióban sűrűbben elhelyezkedő CG dinukleotidok. CpG szigeteknek nevezzük a genom azon szakaszait, ahol a CpG dinukleotidok legalább 60%-os arányban vannak jelen. A CpG szigetek megtalálhatóak a humán gének körülbelül felében, gyakran a transzkripció faktorok által felismert 5' promóter régióban, így közvetlenül szerepet játszanak az adott gének transzkripció szabályozásában [26]. A metilcsoport kapcsolódása egyrészt a transzkripció faktorok bekötődését fizikailag akadályozza, másrészt lehetővé teszi az ún. metil-CpG-kötő doménnel rendelkező fehérjék (pl. MBD1-3, MeCP2) metilált DNS-hez való kapcsolódását, amelyek további fehérjék toborzásával szintén gátló hatással lesznek az adott gén átírására [27]. Emellett a különböző fehérjék kapcsolódása miatt a kromatinstruktúra is átrendeződik, a laza szerkezetű eukromatin helyett tömörebb, heterokromatikus forma válik jellemzővé [28].



4. ábra: A DNS metilációs szabályozás folyamata egészséges és tumorsejtekben. A tumorsejtben a tumorsuppresszor gének hipermetilációja általános jelenség, amely ezeknek a géneknek transzkripciós inaktiválódásához vezet. A daganatképződés során a globális hipometiláció is jellemző, amely során repetitív szekvenciák DNS metilációs szabályozás alól való felszabadulás révén aktiválódnak és genetikai instabilitást eredményeznek. E= exon. Az ábra Esteller és munkatársai alapján, módosítva készült [29].

A metilációs szabályozó rendszer alapvető fontosságú a magasabbrendű szervezetekben. Szerepet játszik az egyedfejlődésben, ahol kezdetben minden CpG sziget demetilált (ún. pre-implantációs demetilációs állapot), majd az embriogenezis blastula stádiumában intenzív remetilációs periódus alatt, az ún. *de novo metilációs* folyamattal kialakul az egyes sejt-, illetve szövettípusokra jellemző metilációs mintázat, amelynek megőrzéséért az ún. *fenntartó metiláció* felelős [25]. Fiziológias állapotban a genomban előforduló CpG szakaszok demetiláltak maradnak, így nem vesznek részt a génműködés szabályzásában. A gén promóterekben elhelyezkedő CpG dinukleotidoknak megváltozhat az eredeti, szövetspecifikus metilációs mintázata, amely csökkentheti vagy fokozhatja az adott gén kifejeződését. Az így aktivált vagy inaktivált

gének funkcióitól függően változhat meg az adott sejt sorsa, protoonkogének DNS metilációs gátlás alóli felszabadulása, illetve tumorszuppresszor gének hipermetilációja egyaránt tumorképződést indukálhat [30].

2.2.1.2.1 DNS metilációs rendszer hibái

A genomi instabilitás mellett az epigenetikai folyamatok zavarai is daganat kialakulásához vezethetnek.

Az életkor előrehaladtával megjelenő aberráns DNS metilációs mintázat kialakulásának gyakorisága - a megfigyelések szerint- egyre magasabb [31]. Az ilyen, úgynevezett korfüggő metilációs változások közé a genom szintű hipometiláció növekedése, másrészt az ezzel párhuzamosan fellépő génspecifikus, lokális DNS hipermetiláció tartozik [32].

A szabályozott géneket mindezek alapján *A-típusú* kor-függő DNS metilációt mutató (*age-related*, pl. *ER*, *MYOD* [31]) és daganatspecifikus *C-típusú* metilációt mutató (*cancer-related*, pl. *p16(INK4A)*, *MLH1*, *TIMP3*) génekként csoportosíthatjuk.

A fenti aberráns metilációs mintázatok kialakulásával egyre nagyobb valószínűséggel érvényesülhet a fokozottan expresszálódó onkogének, illetve a csökkent működésű tumorszuppresszorok hatása, így a sejtenként akkumulálódó epigenetikai változások nagy valószínűséggel vezetnek kontrollálatlan, daganatos sejtproliferációhoz.

A DNS metilációs szabályozó rendszer daganatokban megváltozott működésének eredménye az egész genomra kiterjedő csökkent DNS metilációs szint, az ún. globális hipometiláció és ezzel párhuzamosan a genom bizonyos részein, gyakran a gén szabályozó régiójában bekövetkező regionális DNS hipermetiláció [32]. A globális hipometiláció kromoszóma instabilitást, valamint retrotranszpozonok és onkogének aktiválását okozhatja [33]. Toyota és munkatársai 1999-ben egy olyan CRC csoportot azonosítottak, amelyben bizonyos gének együttesen hipermetilálódnak, ezeket CpG sziget metilátor fenotípusú (CIMP) daganatoknak nevezték el. A CIMP pozitív daganatok a következő tulajdonságokkal rendelkeznek: idős kor, többnyire női betegekben fordul elő, proximális lokalizáció, a *BRAF*^{V600E} mutáció nagy arányú megjelenése, az *MLH1* gén hipermetilációja, a p53 mutáció ritka megjelenése és specifikus szövettani kép [32]. A CIMP osztályozás megosztotta a tudományos világot, az elmélet létjogosultságát sokan ma is megkérdőjelezzik. A CIMP pontos fogalma is folyamatosan átalakul, és bár sok kísérlet irányul a hipotézis alátámasztására, a fogalom

meghatározása még mindig nem egységes. Bár a CIMP fogalom létezése óta a DNS metilációs változások kutatása főként a vastagbél proximális szakaszán megjelenő daganatokra korlátozódott, a vastagbél disztális részén kialakuló CIMP negatív (CIMP-), sporadikus daganatokban is jelentős epigenetikai rendellenességeket, köztük DNS hipermetilációt figyeltek meg [34].

A „field effect”, azaz a „mező hatás” azt a jelenséget takarja, mikor a neoplasztikus elváltozás közvetlen környezetében - bár makro- és mikroszkópikus szinten még nem, de molekuláris szinten már - felfedezhetőek olyan változások, amelyek a daganat kialakulását előrevetítik. A jelenség egyik leggyakrabban vizsgált molekuláris változása a DNS metiláció, amelynek szintje számos vizsgálat eredménye szerint a szövettanilag egészséges vastagbél nyálkahártyában megemelkedik, ha egy szomszédos neoplasztikus elváltozás mellett helyezkedik el [35, 36]. Ez a jelenség is felhívja a figyelmet arra, hogy a tumor melletti és a teljesen egészséges páciensek vastagbél nyálkahártyájának molekuláris tulajdonságai eltérőek lehetnek, így ezeket a szövettípusokat külön mintatípusként célszerű vizsgálni [37].

2.2.3 A vastagbél daganatok diagnózisa, klinikai stádiumbesorolása

A klinikai gyakorlatban a vastagbélrákok diagnózisa az endoszkópos vizsgálattal kezdődik, majd a biopsziás és sebészi úton nyert szövetminták patológiai elemzésével történik. A tumor előrehaladottságának megállapítására morfológiai jegyeket használnak, amellyel a tumor bazális membránon való átlépésétől, környező szervek és a nyirokcsomók érintettségétől függően különböző kategóriákba sorolják a daganatokat. Elsőként Dukes és munkatársai hoztak létre egy osztályozási rendszert, amelyet 1954-ben Aster és Coller módosított [38]. Az általuk javasolt beosztást alkalmazzák a klinikai gyakorlatban, mely szerint a következő stádiumokat különböztetjük meg:

Dukes A: a daganat csak a mukózát érinti

Dukes B1: a daganat a muscularis propria réteget érinti, nyirokcsomó érintettség nincs

Dukes B2: a daganat áttöri a serosát, nyirokcsomó érintettség nincs

Dukes C1: a daganat a muscularis propria réteget érinti, nyirokcsomó érintettség van

Dukes C2: a daganat áttöri a serosát, nyirokcsomó érintettség van

Dukes D: A daganat távoli metasztázisokat képzett

A klinikai gyakorlatban az ún. TNM rendszert is használják, amely a primer tumor (T0, 1, 2, 3, X), a nyirokcsomó érintettség (N0, 1, 2, X) és a metasztázisok (M0, 0, X) szerint sorolja be az adott daganatot (1. táblázat).

1. táblázat: A vastagbél-daganatok klinikai besorolása

TNM beosztás	TNM kritériumok	Dukes beosztás	Aster Coller beosztás
Tis N0 M0	Tis = in situ carcinoma, a tumor a mukózára korlátozódik	-	-
T1 N0 M0	T1 = a tumor a szubmukózába terjed	A	A
T2 N0 M0	T2 = a tumor a muskuláris propriába terjed	A	B1
T3 N0 M0	T3 = a tumor a szubszerózában túl terjed	B	B2
T4 N0 M0	T4 = a tumor a környező szerveket vagy a viszcerális peritoneumot is eléri	B	B3
T1-2 N1 M0	N1 = a környező nyirokcsomók közül 1-3 érintett	C	C1
T3-4 N1 M0	N1 = a környező nyirokcsomók közül 1-3 érintett, T3 vagy T4	C	C2, C3
bármely T, N2 M0	N2 = a környező nyirokcsomók közül 4 vagy több érintett, bármely T	C	C1, C2, C3
bármely T, N M1	M1 = távoli metasztázis igazolt, bármely T, N	-	D

A grade fogalma a daganatot alkotó sejtek differenciáltságáról ad információt egytől négyig terjedő skálán, ahol a besorolás a differenciált sejtektől (G1) a differenciálatlanokig (G4) terjed [39].

2.2.4 A vastagbél-daganatok szűrőmódszerei

A vastagbél-daganatok fejlődése a fent említett molekuláris útvonalakon történhet, amelyekben közös tulajdonság, hogy a tumor kifejlődése akár évekig észrevétlenül történhet, mialatt a rák megelőző állapotú, majd vastagbél-daganatos beteg sokáig tünetmentes. A daganat csak egy bizonyos nagyság és stádium elérése után okoz tüneteket, általában a legtöbb páciens ilyenkor fordul orvoshoz. Ha a daganat diagnosztizálásakor a tumor már Dukes C stádiumú (azaz már nyirokcsomó áttéted ad), akkor az 5 éves túlélési esélyek drasztikusan csökkennek, átlagosan 47,7%-osra. Ha ezt az értéket összehasonlítjuk Dukes A stádiumú páciensek túlélésével (93,2%), egyértelművé válik, hogy a korai felismerés létfontosságú a beteg túlélési esélyei szempontjából. A fentiek tükrében a vastagbélrákot olyan kórképnek tekinthetjük, amely korai diagnózis mellett hatékonyan kezelhető betegség [40], de a túlélési esélyek a tumor fejlődésével és terjedésével párhuzamosan csökkennek.

A vastagbél-daganatok számának csökkentése céljából a tumor kialakulásának megelőzése és a terápiás megoldások fejlesztése mellett a különböző szűrési módszerek hatékonyságának növelése alapvető fontosságú. A korai diagnózis a rák megelőző állapotok hatékony felismerésén alapul, hiszen a CRC ezekből a képletekből fejlődik ki a malignizálódás során [2]. A szűrést a magas rizikójú csoportokban (pl. családi halmozottság esetén), illetve a kor előrehaladtával, 50 év felett feltétlenül ajánlott elvégezni [41].

Ahhoz, hogy egy vizsgálati módszer nagy populáció szűrésére hatékonyan alkalmazható legyen, magas részvételi arányú (compliance), magas szenzitivitású és specificitású, minimálisan invazív, de költség-hatékony módszerre van szükség. Napjainkban többféle szűrőmódszer áll rendelkezésre, ezek közül a kolonoszkópia a legelfogadottabb és leghatékonyabb, ún. „gold standard” módszer, amely a legnagyobb szenzitivitással és specificitással rendelkezik, valamint terápiás beavatkozásra (a rák megelőző polipok eltávolítására) is lehetőséget kínál. A vizsgálatot megelőző előkészítés és a vizsgálat kellemetlenségei miatt azonban sajnálatos módon a vastagbél-daganat szűrésére alkalmazott módszerek közül ez rendelkezik a legkisebb részvételi aránnyal. A további vizsgálatok közül a flexibilis szigmoidoszkópia, a kapszula endoszkópia, valamint a székletvér kimutatásán alapuló az FOBT és a FIT tesztek a leghatékonyabban alkalmazható szűrési módszerek. A flexibilis szigmoidoszkópia egy körülbelül fél

méteres hajlékony csővel végzett vizsgálat, amely a disztális vastagbél vizsgálatára alkalmas [42]. A kolonoszkópiánál olcsóbb, emiatt könnyebben elérhető vizsgálat, viszont a proximális vastagbélről nem ad információt.

A kapszula endoszkópia során az egész vastagbél vizsgálható, de a vizsgálati előkészítés itt is kihívásokkal járhat. Egy 2012-es felmérés adatai szerint a vizsgálat szenzitivitása a 6 mm-nél nagyobb polipokra vonatkoztatva 89%-os volt [43]. Ennek a szűrőmódszernek valószínűleg azoknál a betegeknél lehet a legnagyobb haszna, akik egy inkomplett kolonoszkópián már átestek vagy akiknél a hagyományos kolonoszkópiának valamilyen kontraindikációja áll fent, illetve azon betegeknél, akiket a kolonoszkópia diszkomfortérzete tart vissza a vastagbédaganat szűréstől [44].

A székletben megjelenő vér kimutatására kifejlesztett tesztek közül a költséghatékonyan végezhető, guajak alapú FOBT (fecal occult blood test) vizsgálat a legelterjedtebben alkalmazott. A gFOBT használatával azonban a CRC miatti halálozások száma csupán 15-25%-kal csökkenthető, a teszt alacsony szenzitivitású, sok az álnegatív eset, így a CRC-s betegek 33-75%-át tudjuk csak kiszűrni [45]. Ezzel szemben a humán hemoglobinra specifikus, immun alapú FIT teszt szenzitivitása eléri a 60-85%-ot [46].

A hagyományos szűrőmódszerek mellett a vastagbédaganatok korai felismerését támogatják azok a kutatások is, amelyek különböző típusú biomarkerek azonosítását célozzák. Biomarkernek nevezzük az olyan mérhető paramétereket, amelyek egy adott betegség jelenlétét vagy súlyossági fokát mutatják ki. A biomarkerek lehetnek fehérjék, DNS és RNS alapú markerek is. Még ha csak a klasszikus szűrőmódszerek kiegészítésként is, ezen új markerek használata szükséges lehet a jelenlegi vastagbél adenomák és tumorok felismerésére alkalmas módszerek kimutatási érzékenységének növeléséhez [47].

2.2.5 A vastagbédaganatok molekuláris markerei

2.2.5.1 Genetikai markerek

A marker eltérése/változása szempontjából lehet genetikus (pl. mutáció, deléción, inszerción), epigenetikus (pl. DNS metiláción, hiszton módosítáción, miRNS-ek általi poszttranszkripciós szabályozáción) és fehérje marker is.

A klinikai gyakorlatban használt markerek két nagy csoportba sorolhatóak: prognosztikus markerek, amelyekből a betegség előrehaladására következtethetünk, a

prediktív markerek pedig egy adott terápia alkalmazása esetén várható hatékonyságot jelzik. A prognosztikus markerek közül leggyakoribbak a korábban már említett *APC* és *MMR* gének csírasejtes, illetve szomatikus mutációi, amelyek a daganat kialakulás magas rizikójára utalnak. A prediktív markerek közül klinikai használatban jelenleg az EGFR jelátviteli útban szerepet játszó *KRAS* és *BRAF* gének vizsgálata szerepel, amelyek inaktivációja esetén a páciensben az anti-EGFR terápia hatástalan [48, 49]. A *KRAS* mutációja, amely a CRC-s esetek 40%-ában jelentkezik [2], rossz prognózist jelző marker [50], áttétekben is kimutatható, befolyásolhatja a monoklonális antitest terápiát [51]. A *BRAF* gén mutációja a CRC-k 10%-ában jellemző, valin-glutamin aminosav cserét eredményez (*BRAF^{V600E}*), amely a MEK-ERK útvonal konstitutív aktiválódásához vezet. Egy klinikai tanulmány szerint EGFR gátló terápia esetén a vad típusú *KRAS* mellett vad típusú *BRAF* génnel rendelkező betegek szignifikánsan kedvezőbb terápiás választ mutattak [49]. Azokban a CRC-s esetekben, amelyekben az *MLH1* gén hipermetilációja mutatható ki, az 5-fluorouracil (5'-FU) kezelés nem eredményes [52]. A *SMAD4* gén inaktiválódása esetén szintén csökken az 5'-FU terápia hatékonysága, a gén biállélikus expressziójával rendelkező betegek háromszor nagyobb terápiás előnyt élveznek [53].

A vastagbél-daganatok kimutatásában legígéretesebb biomarkereknek a DNS alapú markerek bizonyultak. A jelenleg elérhető biomarkerek közül a székletből és a vérplazmából izolált DNS alapú markerek intenzíven vizsgáltak. A rák megelőző állapotokból és a daganatokból a bél lumenébe leváló sejtekre jellemző, hogy belőlük az ép sejtekben végbemenő apoptózis hatására keletkező DNS fragmenseknél (megközelítőleg 200 bp) hosszabb DNS szakaszok mutathatóak ki. Ez az ún. hosszú fragmensű DNS szintén jó mutatója lehet a vastagbél-daganatoknak. Zhang és munkatársai 55 egészséges és 130 vastagbélrákos beteg székletéből kivont DNS hosszúságának, intaktságának, valamint az *APC*, a *KRAS*, a *BRAF* és a *p53* hosszú DNS-ek jelenlétének polimeráz láncreakcióval (800-800 bp hosszú amplikonokkal) történő vizsgálatával a CRC-s esetek 56,2%-os szenzitivitással és 96,3%-os specificitással bizonyultak kimutathatónak [54].

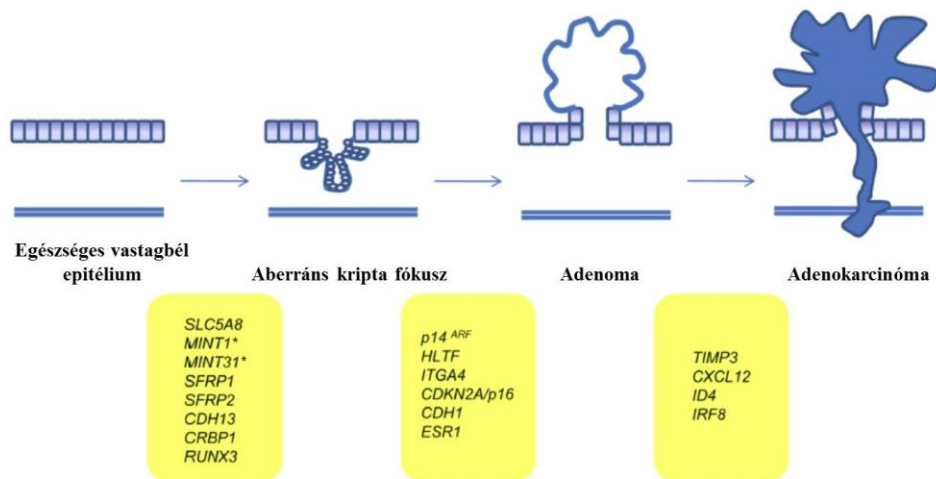
2.2.5.2 Epigenetikai markerek

2.2.5.2.1 DNS metiláció

Régóta ismert, hogy a vastagbél-daganatokban azonosított hipermetilált gének közül számos, pl. tumorszuppresszor gén (pl. *MLH1*, *MGMT*) inaktivációja fokozza a sejtproliferációt és szelektív előnyt jelenthet a tumorsejtek számára [55]. Az azonosított markereket aszerint is csoportosíthatjuk, hogy milyen eredetű mintából nyertük ki őket, így léteznek szövetből, székletből és vérszérumból vagy plazmából izolált epigenetikai markerek.

2.2.5.2.2 A vastagbél-daganatok szöveti DNS metilációs markerei

Már az aberráns kriptá fókuszokban (ACF) is kimutatható néhány gén, mint pl. a *RASSF1A*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *RUNX3*, az *SLC5A8*, a *CRBP1*, a *CDH13* és a *MINT1* és *MINT31* lókuszok hipermetilációja [56]. A kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során számos olyan gént azonosítottak, amely adenomákban nem, de karcinómákban jellemzően epigenetikai csendesítés alatt áll. A fentiek alapján a DNS metiláció malignus átalakulás folyamatában betöltött fontos szerepe feltételezhető [57]. A késői adenomákban a koraiakhoz képest egyre több gén metilálódik, amely azt jelzi, hogy a DNS metiláció a tumorképződés meghatározó korai eseménye lehet [58]. Az adenoma-karcinoma átmenet során korán bekövetkező DNS metilációs változások többek közt a *CDKN2A/p16*, a *p14*, a *HLTF*, az *MGMT*, a *MINT31*, az *ITGA4*, az *SLC5A8* és az *SFRP2* géneket érintik, ezek ismerete hasznos lehet a korai felismerés szempontjából [59, 60]. Vannak olyan gének, amelyek hipermetilációja főleg karcinómákra jellemzőek, mint pl. az *MLH1*, a *GSTP1* és a *THBS1* [61], míg bizonyos gének fokozott metilációja mindkét csoportban azonosítható (*MGMT*, *HLTF*, *CDKN2A/p16*). A fentiek alapján azt feltételezhetjük, hogy néhány gén aberráns metilációja már adenoma állapotban jellemző, majd további gének metilációja a malignus átalakulás során játszhat kulcsszerepet. Előrehaladott vastagbél-daganatokban és áttétekben a *TIMP1*, az *ID4*, a *CXCL2* és az *IRF8* gének DNS hipermetilációja igazolt, amely eredmények alapján feltételezhető, hogy a tumoros sejtekben ezen gének csendesítése növekedési és terjedési előnnyel járhat [58].



5. ábra: A vastagbédaganatok kialakulása során az egészséges vastagbél epitéliumból kiinduló daganatfejlődés állapotaira jellemző DNS hipermetiláció által szabályozott gének. Az ábra Lao és munkatársai alapján, módosítva készült [62].

2.2.5.2.3 A vastagbédaganatok széklet epigenetikai markerei

A székletből izolált markerek előnye, hogy invazív mintagyűjtés nélkül vizsgálhatóak, így klinikai jelentőségük kiemelkedő lehet a jövőben. Kézenfekvő megközelítés, hogy a bélcsatornában jelenlévő szöveti elváltozások jellemző molekuláris változásait a róluk leváló sejtekből, így közvetve a székletből is lehetőségünk van vizsgálni. A szakirodalomban leggyakrabban szereplő CRC székletmarker a vimentin (*VIM*). Egészséges vastagbélhamban a gén első exonjában található CpG sziget metilátlan, vastagbédaganatos betegekben hipermetilálttá válik, amely nagy hatásfokkal kimutatható a CRC-s székletmintákból izolált DNS mintákban is [63, 64]. További gének aberráns DNS hipermetilációja, köztük a *GATA4/5* gének közül a *GATA4* hipermetilációja alapján a CRC-s és a kontroll mintákat jelentős szenzitivitással (51%) és specificitással (93%) lehetett elkülöníteni [65]. Az *SFRP* gének közül több (*SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*) hipermetilált CRC-s betegek székletmintájában, ezek közül az *SFRP2* bizonyult a legígéretesebb markernek, amely 57%-os szenzitivitással és 90%-os specificitással rendelkezett az CRC vs. egészséges összehasonlításban [66]. A biztató eredmények mellett meg kell említeni, hogy a széklet markerekkel végzett validációs vizsgálatok a magas fals negatív és fals pozitív eredményekre hívják fel a figyelmünket,

amin a jövőben valószínűleg a vizsgálati módszerek módszertani fejlesztésével lehetőség lesz javítani [57].

2. táblázat: A vastagbél-daganat széklet DNS metilációs markerei

Gén szimbólum	Gén név	Referencia
CDKN2A/P16	ciklin-függő kináz inhibitor 2A	[57]
GATA4	GATA kötő fehérje 4	[65]
HIC1	rákban hipermetilált gén 1	[67]
ITGA4	integrin alfa 4	[68]
MGMT	O-6-metilguanin-DNS metiltranszferáz	[57]
NDRG4	N-myc downstream-szabályzott gén 4	[69]
OSMR	onkosztatin M receptor- β	[70]
PGR	progeszteron receptor	[71]
SFRP2	szekretált frizzled-rokon fehérje 2	[71]
SFRP5	szekretált frizzled-rokon fehérje 5	[71]
VIM	vimentin	[63]

2.2.5.2.4 A vastagbél-daganatok szérum/plazma DNS metilációs markerei

A vérszérumból vagy plazmából izolált markerek minimális invazivitással vizsgálhatóak, így klinikai alkalmazásuk szintén ígéretes lehet. Igazolt, hogy a tumorokból kiszabaduló sejtekből származó nukleinsavak bekerülnek a vérkeringésbe és a tumorra jellemző molekuláris változásokat hordozzák, így a sejtmentes, keringő nukleinsavak a szervezetben kialakuló kóros folyamatok értékes jelzői lehetnek. Számos vizsgálat tűzte ki célul a szérumból és/vagy plazmából kimutatható DNS metilációs markerek azonosítását. Az egyik ilyen tanulmány a *HLTF* (helikáz-szerű transzkripció faktor) gén hipermetilációját írta le, amelynek mértéke jól korrelált a tumor méretével és stádiumával [72].

3. táblázat: A vastagbél-daganat szérum/plazma DNS metilációs markerei

Gén szimbólum	Gén név	Referencia
ALX4	arisztalessz-szerű homeobox 4	[73]
CDKN2A/P16	ciklin-függő kináz inhibitor 2A	[74]
HLTF	helikáz-szerű transzkripció faktor	[75]
MLH1	MutL homológ, vastagbél-daganat, nonpolipózis 2	[76]
NGFR	idegi növekedési faktor receptor	[77]
RUNX3	Runt-rokon transzkripció faktor 3	[74]
SEPT9	septin 9	[77]
TMEFF2	transzmembrán protein EGF-szerű és két follisztatin-szerű doménnel 2	[77]

Egy másik tanulmányban 133 CRC-s és 179 egészséges páciens plazmájában vizsgálták 3 gén (*TMEFF2*, *NGFR*, *SEPT9*) DNS metilációs szintjét. A vizsgálatban a CRC-s és az egészséges minták elkülönítését a *SEPT9* (Septin 9) DNS hipermetilációja alapján sikerült legnagyobb érzékenységgel (69%) és specificitással (86%) végrehajtani, ezért ezt a markert további vizsgálatoknak vetették alá [77]. További megerősítő kísérletek során a *SEPT9* vastagbél-daganatok kialakulása során megjelenő DNS hipermetilációja igazolódott, így mára a plazmából izolált keringő szabad DNS markerek közül a legelterjedtebb és legismertebb DNS metilációs markerré vált.

A *SEPT9* gén a vastagbél-daganatokkal összefüggésbe hozott, egyik leggyakrabban vizsgált DNS metilációs marker. A gén GTP-kötő fehérjéket kódoló géncsaládba tartozik, a keletkező fehérjék komplexekbe rendeződve filamentózus struktúrákat hoznak létre, amelyek a sejtvázat alkotják. A Septin9 fehérje a sejtmembrán megfelelő merevségét biztosítja, kapcsolatban áll az aktin és tubulin filamentumokkal és szerkezeti állvány (scaffold) proteinként egyéb fehérjéket organizál a sejtben [78, 79]. Szerepet játszik a sejtosztódás citokinezis fázisában, ahol a két keletkező utódsejt osztódásában van kritikus szerepe. A Septin fehérjék családjára jellemző az alternatív splicing jelensége, amely során a gént kódoló intron és exon szakaszok különböző mintázatban vágódnak ki a génről átíródó pre-mRNS szakaszból. A gén szerkezetileg bonyolult, 219 kb hosszú, 18 különböző transzkriptuma összesen 15 különböző polipeptidet kódol

(*SEPT9_v1*, *v2*, *v3*, *v4*, *v4**, *v5*) [80, 81]. Több CpG sziget is előfordul a génszakaszban, amelyek DNS metilációs szintjei különböző mértékben befolyásolhatják a transzkriptumok kifejeződését. Fokozott vagy csökkent kifejeződését számos tumortípusban leírták; ovárium daganatokban a gén csendesítés alá kerül, míg emlődaganatokban fokozottan működik, így tumorszuppresszorként és onkogénként egyaránt számontartják [82]. Későbbi vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a gén sok szövettípusban kifejeződik, de a különböző izoformái eltérő szinten vannak jelen a különböző szövetekben [83]. A *SEPT9_v1* túlzott kifejeződése emlő, ovárium és prosztatatarákban is kimutatható volt, míg az ép szövetekben nem [84, 85]. A *SEPT9_v3* transzkriptum fokozott működést mutatott számos sejtvonalban, de azokban nem, amelyekben a Septin 9 fehérje sem fejeződött ki [86] Másik két transzkriptum, a *SEPT9_v4*, *v4** ugyanazt a polipeptidet kódolja, de a sejtet ért stresszhatások hatására megváltozik a transzkriptumok kifejeződése; a *v4** a malignus folyamatban játszik szerepet [87].

A *SEPT9* gén CRC-ben epigenetikusan szabályozott markerként való azonosítása után nemsokkal a német székhelyű Epigenomics cég egy teljes vizsgálati tesztet (proColon 2.0 kit) bocsátott piacra a feltételezhetően tumorból származó, majd később a véráramba kerülő *SEPT9* fragmentum metiláltságának vizsgálatára [88, 89]. Később más cégek (Abbott Molecular, Quest Diagnostics, ARUP Laboratories, Warnex Laboratories) által fejlesztett *SEPT9* DNS metilációs tesztek is piacra kerültek [90]. Az előszűrésre alkalmas *SEPT9* kit fejlesztésével egyre nagyobb szenzitivitást és specificitást értékek érhetőek el mind a különböző CRC stádiumokban, mind a rák megelőző polipok kimutatása során. Egy 2014-es, összesen 135 CRC-s, 169 adenoma és 91 egészséges kontroll esetet elemző vizsgálat szerint az Epi proColon 2.0 kit 74,8%-os szenzitivitással és 87,4%-os specificitással tudta a vastagbél-daganatos eseteket kimutatni, míg a késői adenomákat 27,4%-os érzékenységgel sikerült felismerni [91]. A különböző vizsgálatokban mért érzékenységi és fajlagossági értékek eltérhetnek, az eredményeket befolyásolhatja a vizsgálatba bevont betegek száma, a bevonás kritériumai és a vizsgálat technikai kivitelezésben lévő különbségek is.

Bár a keringő *SEPT9* DNS metilációs szintjét vérplazma mintákból mára már magas szenzitivitással és specificitással tudjuk mérni, arról napjainkban is viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre, hogy a DNS hipermetiláció a vastagbél-szövetben

milyen mértékű és ez hogyan befolyásolja a gén mRNS és fehérjeszinten való kifejeződését.

2.2.5.2.5 Egyéb epigenetikai szabályozó mechanizmusok

2.2.5.2.5.1 Nem-kódoló RNS-ek

A leggyakrabban vizsgált nemkódoló kis-RNS-ek a 18-22 nukleotid hosszú poszt-transzkripcionális szabályozást végző mikroRNS-ek (miRNS). A velük komplementer szekvenciájú cél-mRNS molekulákhoz kapcsolódva annak csökkent vagy megszűnő kifejeződését eredményezik. A fenti fontos szabályozó mechanizmus sok daganattípusban igazoltan zavart szenved: az alul- és felülszabályozódó miRNS-ek jelentősen hozzájárulhatnak a tumorkialakulásának bonyolult folyamatához. A vastagbél-daganatok kialakulásának vizsgálata során több miRNS is azonosításra került. Az egészséges vastagbélhámhoz képest adenoma mintákban jellemző a miR-143, a miR-18a, a let-7 alul- és a miR-21 felülexpressziója, míg CRC-s esetekben a miR-200 család csökkent és a miR-21 miRNS-ek emelkedett kifejeződése jellemző [92].

A 200 bázispárnál hosszabb, fehérjét nem kódoló RNS-ek (hnkRNS-ek - lncRNA) szintén intenzíven kutatott szabályozó RNS-ek, amelyek a génexpressziót közvetetten fehérjék kötésével, a kromatinstruktúra átrendezésével, miRNS-ek módosításával, hisztonfehérjék módosításával, DNS metiltranszferázok regulációjával, végső soron az eukromatin-heterokromatin arányának módosításával szabályozhatják [93].

2.2.5.2.5.1 Hiszton módosítások

A kromatin legfőbb fehérjéi a hisztonok, amelyek a DNS-t kompakt szerkezetbe rendezik. A hisztonfehérjék N-terminális vége lizinben és argininben gazdag, amely aminosavak metiláció, acetiláció, foszforiláció, ubikvitináció és ADP-ribosziláció célpontjai lehetnek, ezáltal különböző kromatinstruktúrát alakítanak ki, így a génexpresszió szabályozásában jelentős szereppel bírnak [94].

2.3 Szöveti minták expressziós és epigenetikai eltéréseinek vizsgálatára alkalmazott molekuláris biológiai módszerek

2.3.1 Szövetminták típusai és vizsgálati lehetőségeik

2.3.1.1. Szöveti minták típusai és vizsgálati lehetőségei

Az endoszkópos vizsgálatok során nyert és a műtétileg eltávolított szövetminták rutin diagnosztikai vizsgálatok céljára a műtét után közvetlenül leggyakrabban 4% pufferolt formalinba kerülnek, majd víztelenítés után paraffinba ágyazva szövetminta blokkot készítenek belőlük. Ezenkívül - bár a rutin diagnosztikában ritkán, de kutatási célokra gyakran- fagyasztott szövetminták gyűjtésére is van lehetőség.

A génextpressziós vizsgálatok során elemzett legideálisabb mintatípus a friss fagyasztott szövet, amelyből kivont nukleinsavakat magas integritás és tisztaság jellemzi. A friss fagyasztott szövetminták gyűjtése és tárolása -amely speciális logisztikai feltételeket és extra ráfordított időt igényel- viszont néha nehézségekbe ütközik. Ezzel szemben a formalin-fixált, paraffinba-ágyazott (FFPE) szövetminták gyűjtése a rutin patológiai feldolgozás során megoldott, a minták tárolása pedig nem igényel speciális körülményeket. A vastagbél kóros elváltozásainak diagnózisa rutin endoszkópiával nyert biopsziás vagy műtétileg eltávolított szövetminták FFPE blokkjainak metszeteiből történik. A formalinos fixálás tökéletesen megőrzi a szövetek struktúrális felépítését, azonban a molekuláris szerkezet szempontjából technikai hátrányokkal jár, pl. a nukleinsavak keresztkötése, töredezése [95, 96]. Ezáltal az FFPE mintákból izolált RNS gyakran töredezett és alacsony integritással rendelkezik, emiatt az FFPE szövetek a génextpressziós vizsgálatok során kihívást jelentő mintáknak számítanak. Annak érdekében, hogy az FFPE minták használhatósága egyre bővülhessen, a manuális és automatizált nukleinsav kivonási eljárások folyamatos fejlesztés alatt állnak [97, 98]. Az automatizált rendszerek a nagy mintaszámmal dolgozó laboratóriumok számára jelentős segítséget jelenthetnek, mivel ezek a protokollok a kézi izolálási módszereknél standardizáltabbak, és kevesebb gyakorlati időt igényelnek [99].

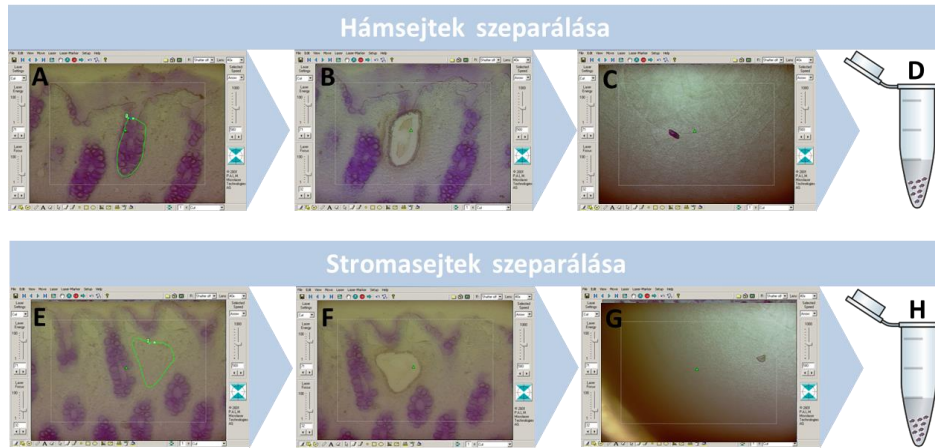
A DNS az RNS-nél stabilabb molekula, és bár kivonásra több száz éves leletekből is lehetőség van, a hosszú tárolású FFPE blokkokból kivont DNS alkalmazását szintén korlátozhatja a nukleinsav degradáció, amelyet a formalin DNS-t károsító hatásán túlmenően a DNS metilációs vizsgálatok egy részében alkalmazott biszulfid konverzió

tovább fokoz. A fentiek ellenére DNS metilációs vizsgálatokra - a megfelelő optimalizációs lépések után - mind friss fagyasztott, mind FFPE minták megbízhatóan alkalmazhatóak [100].

2.3.1.2. Lézer mikrodisszekció

Mind az egészséges, mind a daganatos szövetminták különböző típusú sejtekből állnak. A vastagbél-daganat kialakulása során a hámréteg kóros proliferációja következik be, amely a daganat előrehaladottságától függően a környező szövetrétegekbe tör. Ahhoz, hogy a különböző sejttípusokban zajló molekuláris különbségeket megvizsgálhassuk és a tumorképződés háttérben rejlő molekuláris folyamatokról bővebb információt nyerjünk, szükség van a különböző sejttípusok elkülönítésére és külön-külön történő vizsgálatára, amely a szövettani metszetek lézer mikrodisszekciójával (LCM) valósítható meg.

Napjainkban több cég által gyártott lézer mikrodisszektor készülék is elérhető. Ezekben a készülékekben közös, hogy egy mikroszkóppal kombinált lézergenerátor egység teszi lehetővé, hogy a tárgylemezről a megadott pozíciókból sejteket vágjon ki, majd juttasson egy gyűjtőfelületre (6. ábra). Ehhez a mikroszkóp objektíven keresztül mikrolézersugár halad át, majd a kijelölt pozícióban fókuszált lézersugár impulzusa körbevágja a kívánt sejtcsoportot. Az izolált szövetdarab egy újabb impulzus (Zeiss) vagy a gravitáció (Leica) segítségével a gyűjtőfelületre juttatható. A szövettani metszeteken lehetőségünk van általános festési eljárást (pl. hematoxilin-eozin) alkalmazni és a sejteket a morfológia alapján elkülöníteni, vagy esetleg valamilyen sejttípusra specifikus festést (pl. egy adott marker immunhisztokémiával való kimutatása) használni. A kívánt sejtszám mikrodisszekciója után az általunk választott sejttípus feldúsított mennyiségben áll rendelkezésünkre, amely manapság elérhető, kis sejtszámra optimalizált (fehérje, RNS, DNS, miRNS, stb.) izolációt követően és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgálható tovább. Az onkológiai kutatások területéről számos tanulmány igazolja a lézer mikrodisszekció használatának előnyét [101, 102].



6. ábra: Egészséges vastagbél szövetminta lézer mikrodisszekciójának folyamata. A lézer mikrodisszekciós szoftver segítségével lehetőségünk van kijelölni a kívánt sejtcsoportot, jelen esetben a vastagbél kriptákat alkotó hámsejteket (A) és a stromasejteket (E). Ezután a lézernyaláb a kijelölt pozícióban fókuszálva kivágják a sejtcsoportot (B, F), majd a tárgylemez felé helyezett adhezív felszínű centrifugacső kupakjába katapultálják (C, G). Ezáltal a folyamat végén a hám (D) és stromasejtek (H) külön-külön vizsgálhatóak.

2.3.2 Génexpressziós vizsgálatok

A génexpressziós vizsgálatok alapja a Kary Mullis által kifejlesztett polimeráz láncreakció (PCR) napjainkban a leggyakrabban alkalmazott génexpressziót vizsgáló módszer [103]. Ezenbelül a reverz transzkripciót követő, valós idejű PCR (RT-PCR) a legelterjedtebb módszer, amely során az RNS molekulákról komplementer DNS (cDNS) készül, majd ennek mennyisége elemzése történik. A reakció során felszaporított amplikonok által gerjesztett fluoreszcens szignál vizualizációja génexpressziós vizsgálatokban leggyakrabban egy interkalálódó DNS festék vagy fluoreszcens próbák hozzáadásával történik, majd a készülék folyamatos detektálás mellett valós időben méri a keletkezett termékek mennyiségét. Ez a módszer nagy pontossággal alkalmas a vizsgált cDNS templát mennyiségének megállapításához, azonban csak limitált számú gén kifejeződésének vizsgálatára alkalmas. Egy daganat kialakulása azonban komplex molekuláris biológiai folyamatok eredménye, így több gén együttes vizsgálatára van szükség, amely többek közt a nagy áteresztőképességű, array alapú rendszerekkel kivitelezhető. Ezért a PCR technika a szűrések során kiválasztott célpontok megerősítése (validációja) során használatos.

2.3.2.2 *Microarray technológia*

A nagy áteresztőképességű vizsgálatok alapja sok célpont együttes vizsgálatának lehetősége. A gének kifejeződési szintjének vizsgálati módszereiben az utóbbi évtizedekben jelentős fejlődés történt, az array alapú technikák megjelenése óta egyre több célpont egyre pontosabb mérésére van lehetőség. Microarray-nek hívjuk azokat a tesztek, amelyeknél egy üveg vagy szilikon felületre 200 µm-nél kisebb átmérőjű pontban ismert DNS szekvenciákat, ún. próbákat rögzítenek előre meghatározott sorrendben és elrendezésben. A nagy denzitású array-ek oligonukleotidjainak felépítése fotolitográfias módszerrel történik, amely során maszkok segítségével rétegenként *in situ* építik fel a próbákat a felületen a bázisok egyenkénti hozzáadásával.

A leggyakrabban alkalmazott oligonukleotid array-ek szilárd felületükön több ezer pontban tartalmazzák a vizsgálni kívánt transzkriptumra specifikus rövid szakaszokat, amelyhez többlépcsős mintaelőkészítést követően a mintában jelenlévő oligonukleotidok a bázispárosodás szabályai szerint kapcsolódnak. A létrejött hibridizációt különböző jelölő lépések segítségével fluoreszcens jelként detektálhatjuk. A microarray-ek használatával így több ezer gén együttes vizsgálata vált lehetségessé, így ezek a vizsgálati módszerek a komplex onkológiai kérdések megválaszolásában is teret nyertek. A microarray módszerekkel lehetőségünk van a vizsgált sejtekről egy statikus génkifejeződési képet kapni, amelyet expressziós profilnak nevezünk. A különböző mintacsoportok profilozása után az elemzett géneket összehasonlíthatjuk a csoportok között, és azonosíthatjuk azokat, amelyek a két állapot között jelentősen eltérő kifejeződést mutatnak. Az azonosított elkülönítő géncsoportok – a megfelelő validációs kísérleti eredmények után - egy betegségre vagy állapotra jellemző diagnosztikus, prognosztikus markerekként hasznosíthatóak [104]. Az egyik leggyakrabban használt génexpresszió vizsgálatára alkalmas oligonukleotid array az Affymetrix cég által gyártott HGU133 Plus 2.0 típusú chip, amellyel több mint 47.000 transzkriptum egyidejű vizsgálata kivitelezhető.

Újabban a kódoló gének expressziós vizsgálata mellett megjelentek a különböző nem kódoló RNS-ek, mint például a miRNS-ek és hosszú, nem kódoló RNS-ek (lncRNA) vizsgálatára alkalmas array vizsgálatok is. A keletkező adatokból kiindulva, az mRNS vizsgálatokhoz hasonló módszerekkel azonosíthatóak a különböző betegcsoportok közt eltérő kifejeződést mutató transzkriptumok. A kiválasztott mikroRNS vagy hosszú nem

kódoló RNS-ek változó expressziós változásainak megerősítésére független módszerek, például a PCR vagy hibridizációs alapú technikák állnak rendelkezésre.

2.3.2.3 RNS in situ hibridizáció

A fent említett módszerekkel lehetőségünk van egy adott homogenizált szövetmintából meghatározni bizonyos transzkriptumok szintjét. Ismert, hogy a szövetet alkotó sejtek különböző transzkripciós profillal rendelkeznek, sőt, a gének kifejeződése egy adott sejtcsoporton belül is eltérhet. Az ilyen különbségek azonosítására lehet használatos technika az in situ hibridizáció, amely nem csak a kifejeződés mértékéről, hanem a szövetbeli, akár sejtbeli lokalizációról is információt szolgáltat. A módszer során deparaffinálás és a megfelelő emésztési és feltárási lépések után a vizsgált RNS-sel komplementer próbákat hibridizálunk a szövettani metszetre. A próbák átlagosan 20-25 bp hosszúak, lehetnek RNS vagy DNS, esetleg módosított DNS (LNA- lakatolt nukleinsav) alapúak [105]. A hibridizáció kimutatására használhatunk direkt jelölt próbákat, vagy különböző jelamplifikációs rendszereket is. A jelek elemzése és értelmezése a hagyományos immunhisztokémiai módszerekkel kapottakhoz jelekhez hasonlóan történik.

2.3.3 DNS metilációs vizsgálatok

A DNS metiláció napjainkban intenzíven kutatott jelenség, így vizsgálatára számos módszer vált széleskörűen alkalmazottá. A vizsgálatok alapvetően két fő csoportba sorolhatóak, a teljes genom-szintű DNS metilációs elemzésre, amely a jelenlévő metil-citozinok teljes szintjét vizsgálja, és a gén-specifikus metilációs analízisre, melynek célja egyszerre csak egy gén metilációs státuszának meghatározása.

2.3.3.1 Teljes genom-szintű DNS metilációs vizsgálatok

A teljes genom-szintű DNS metilációs elemzésének célja, hogy olyan régiókat azonosítson a genomban, amelyek metilációs mintázata megváltozik rákmegelőző vagy tumoros állapotokban. Ez egy összehasonlító vizsgálat, ahol az egészséges referencia mintákhoz történő változásokat azonosítják a vizsgált mintákban. Erre példa többek közt a MeDIP (Methyl-DNA Immunoprecipitation) módszer, ahol a metilált DNS szakaszok 5'-metil-citozin specifikus ellenanyagokkal történő feldúsítását követően a metilált DNS szekvenciák azonosítása microarray (MeDIP-chip) vagy szekvenálás

(MeDIP-Seq) alapú technikákkal történik. A Methyl-Cap hasonló módszer, amely a humán MeCP2 fehérje metil-kötő doménjét használja a precipitációhoz. A módszer lehetővé teszi a teljes genom metilációs eseményeinek vizsgálatát, hátránya viszont, hogy jelentős kiindulási mintamennyiséget igényel. A feldúsított metilált szekvenciák elemzésére különféle nagy teljesítményű készülékek és technológiák állnak rendelkezésre, mint pl az Infinium HumanMethylation450 BeadChip array, amellyel több mint 485.000 CpG dinukleotid vizsgálata lehetséges.

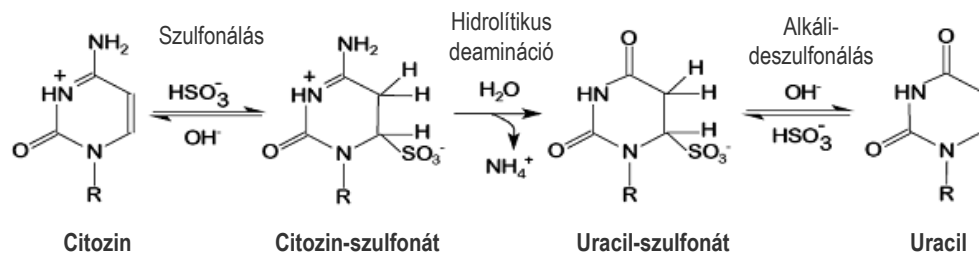
2.3.32 Génspecifikus DNS metilációs vizsgálatok

2.3.3.2.1 Nem biszulfít konverzió alapuló módszerek

A nem biszulfít konverzió alapuló DNS metilációs vizsgálatok esetében metiláció szenzitív és metiláció-függő restriktív endonukleázokat használnak a vizsgált DNS minta metilációs állapotának felméréséhez. A leggyakrabban alkalmazott metiláció szenzitív enzimek a HpaII és a SmaI nem hasítják a metilált DNS-t, a legelterjedtebb metiláció inszenzitív enzimek az MspI és a XmaI mind a metilált, mind a nem metilált DNS szekvenciát hasítják. Az enzimátikus hasítás után PCR technikával vizsgálhatjuk, hogy egy adott pozícióban alkalmazott enzim kombinációk hogyan befolyásolják a termék képződést, hasítás esetén a termékképződés gátolt.

2.3.3.2.2 Biszulfít konverzió alapuló módszerek

A génspecifikus metilációs mintázat vizsgálatára számos módszer kínálkozik, amelyek többsége a DNS biszulfít konverzióján alapul. A biszulfít konverzió során a genomiális DNS szekvenciában előforduló CpG szigetekben elhelyezkedő citozinok metilációs státuszát határozhatjuk meg. A módszer lényege, hogy a nem metilált citozin nukleotidok a biszulfít reakció során uracillá alakulnak (7. ábra), míg az 5. szénatomon metil-csoportot tartalmazó citozinek nem változnak.



7. ábra: A biszulfit konverzió folyamata. Nátrium-biszulfit kezelés eredményeképpen a nem metilált citozin nukleotidok nukleofil támadást szenvednek és uracillá alakulnak, az 5-metilcitozin nukleotidokat nem érinti a módosítás. Az ábra a <http://www.grailmaster.com/genetics/protocols.shtml-Dateien/schumachersguide1.pdf> szerint, módosítva készült./

Így a metilálatlan citozin pozíciójában egy pontmutáció keletkezik, amely hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel tovább vizsgálható. A biszulfit konverziót követő vizsgálatok is két nagy csoportra bonthatóak: a metiláció-specifikus PCR (MSP) reakción és a nem metiláció-specifikus PCR reakción alapuló elemzésekre.

Az egyszerűsége miatt széles körben alkalmazott MSP során a primerek csak a metilált, konvertált szekvenciára specifikusak, így a termék kimutatása az eredeti minta metiláltságára utal. Mára már számos MSP-n alapuló alkalmazást is kifejlesztettek, ilyen például a MethyLight elnevezésű valós idejű PCR reakció is, amellyel egy-két CG dinukleotid metiláltságáról szerezhetünk információt.

A nem metiláció-specifikus PCR reakción alapuló technikák esetén a primerek a konvertált mintára specifikusak, de a primer kötőhelyek nem CpG dinukleotidokra esnek, így ideális esetben a felszaporított termékben a metilált és nem metilált amplikonok egyaránt, az eredeti mintára jellemző arányaik szerint szerepelnek. Ez a módszer a biszulfit-specifikus PCR (BS-PCR).

Egyszerű és költséghatékony DNS metilációt vizsgáló módszer a BS-PCR reakciót követő nagyfelbontású olvadáspont elemzés. A PCR során felszaporított amplikonokban a metilált citozinok szekvenciája a biszulfit konverzió után C-ként, míg a nem metilált citozinoké T-ként szerepel. A kettőszálú PCR termékekben a C-G nukleotidok közt 3, míg az A-T nukleotidok között csak 2 hidrogénhid kötés jön létre. Emiatt ha az amplikonokhoz interkalálódó festéket adunk és folyamatos melegítés mellett észleljük a fluoreszcencia szintet, akkor a fluoreszcencia az amplikonok szekvenciája szerint fog

csökkenni. Eszerint az eredeti szekvenciában nem metilált szakaszok alacsonyabb, míg a metilált szakaszok magasabb hőfoknál disszociálnak. Az eredményként kapott disszociációs görbe alakjából a metilációs százaléokra tudunk következtetni. Ez a módszer a metilációs-specifikus nagy felbontású olvadáspont analízis (MS-HRM).

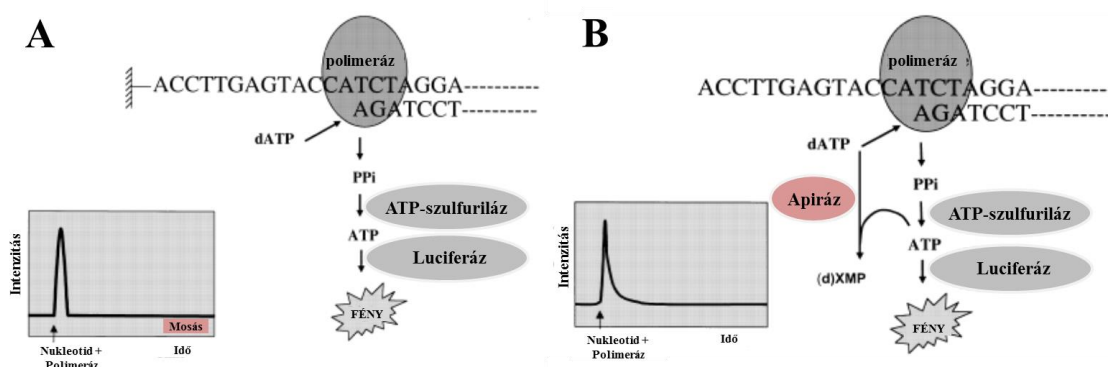
Napjainkban a szekvenálás alapú vizsgálatok kerültek előtérbe, mivel lehetőségünk nyílik egyszerre több CpG pozíció metiláltságát is megállapítani. Ez történhet a hagyományos DNS szekvenálással illetve piroszekvenálással is. A hagyományos módszer esetén is kétféle stratégiát követhetünk: a klónozás-alapú illetve a direkt szekvenálást. A direkt szekvenálás során a biszulfít konvertált DNS templátról az ún. biszulfít-specifikus PCR reakcióban az általunk vizsgálni kívánt szakasz felszaporítása után közvetlenül elvégezhetjük a szekvenálást. Amennyiben a biszulfít szekvenálás eredményében az adott CG dinukleotid a kezelés után változatlanul „CG”-ként jelentkezik, úgy a vizsgált CpG helyet metilálnak, míg ha „TG”-re konvertálódik, úgy metilátlannak tekinthetjük. Amennyiben az adott kromatogram csúcs C és T nukleotid jelből is áll, úgy részleges metiláció feltételezhető.

A hagyományos Sanger szekvenálási módszer sokáig a leggyakrabban használt bázissorrend meghatározó technika volt. Ez a didezoxi lánctermináción alapuló reakció alkalmas a DNS szekvencia pontos leolvasására [106], viszont hátránya a reakció relatív magas költsége. Bár az újabb technikák megjelenésével a Sanger szekvenálás háttérbe szorult, továbbra is meghatározó módszer maradt többek közt a rutin diagnosztikai vizsgálatokban.

Az 1996-ban Ronaghi és munkatársai által leírt piroszekvenálás módszerének alapja a szintézis alapú szekvenálás, amely során a templát szállal komplementer nukleotid beépülése után felszabaduló pirofoszfát csoportot (PPi) mutatjuk ki.

Kétféle rendszer létezik, az elsőként leírt szilárd fázisú piroszekvenálás [107], amelynek továbbfejlesztett változata a folyékony fázisú piroszekvenálás [108]. A többszörös enzimatis reakció során a dezoxi nukleotidokat (dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP) meghatározott sorrendben, ciklikusan adagoljuk a rendszerhez, amelyek a komplementer szekvenciának megfelelően beépülnek, majd a felszabaduló pirofoszfát (PPi) az ATP szulfuriláz enzim működése által ATP-vé alakul, amely energiát szolgáltat a luciferáz enzimnek, végül pedig a luciferin oxidálásával fényt generál (8. ábra). A szilárd fázisú piroszekvenálás során a templát szilárd fázishoz (pl. mágneses gyöngy)

kötött, 3 enzim hozzáadásával történik a reakció (polimeráz, ATP-szulfuriláz, luciferáz), majd minden ciklus után egy mosó lépés következik. Ezzel szemben a folyékony fázisú piroszekvenálási reakció során még egy enzim hozzáadása történik, így összesen 4 enzim játszik szerepet (polimeráz, ATP-szulfuriláz, luciferáz, apiráz), az apiráz enzim a reakció bomlástermékeinek és a be nem épült nukleotidok eltávolításáért felel. A nukleotid beépülés szobahőmérsékleten átlagosan 3-4 másodpercet vesz igénybe, az ezt követő reakciók közül a mosó lépés miatt a szilárd fázisú piroszekvenálás a gyorsabb. A két technika a leolvasási hossz szempontjából is eltér, a folyékony fázisú piroszekvenálással jelenleg több bázispár olvasható le, mint a szilárd fázisú piroszekvenálás módszerével, amely különbség éppen a mosó lépés vs. enzimatis lebontásból ered, a jel/zaj arány a szilárd fázisú reakcióban kevesebb nukleotid beépülése után lecsökken, mint a folyékony fázisú piroszekvenálás esetén.



8. ábra: A kétféle piroszekvenálási módszer sematikus összefoglalása. A) szilárd fázisú piroszekvenálás három enzim (polimeráz, ATP-szulfuriláz és luciferáz) használatával. B) folyékony fázisú piroszekvenálás négy enzim (polimeráz, ATP-szulfuriláz, luciferáz és apiráz) alkalmazásával. Az ábra Ronaghi és munkatársai alapján, módosítva készült [109].

A fényjeleket a piroszekvenátor készülékben lévő töltéskapcsolt (CCD) kamera érzékeli, a szekvencia bázissorrendjére a hozzáadott nukleotidok és a felvillanások sorrendjéből következtethetünk. A mért fény erőssége a beépülő nukleotidok mennyiségével arányos, gyakorlatban 4-5 azonos nukleotid beépüléséig arányosan megfeleltethető a nukleotidok számának. Ebből következik, hogy az ennél hosszabb homopolimer szekvenciák azonosítása ezzel a technikával kihívást jelentenek.

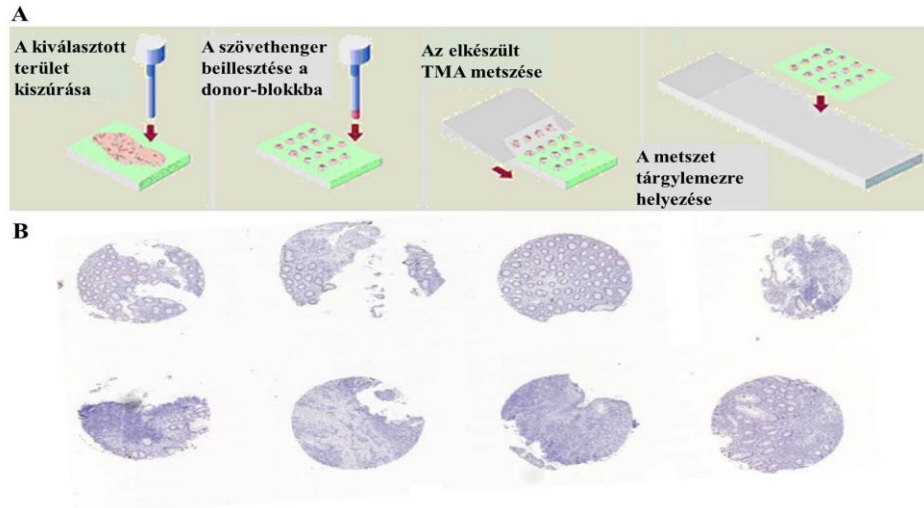
A különböző szekvenálási módszerek a mutációs elemzések mellett a DNS metilációs szintek vizsgálatára is alkalmasak. A biszulfít konverziót követően a metilált és a nem metilált citozinok gyakorlatilag pontmutációként jelentkeznek, így a T és C nukleotidok arányából következtethetünk a minta eredeti metiláltsági szintjére.

2.3.4 Fehérjék kimutatása

A biológiai mintákban található különböző fehérjék jelenlétét és szintjét különböző módszerekkel tudjuk kimutatni. Az általános összfehérje mennyiséget pl. Bradford módszerrel, egy adott fehérje mennyiségét pontosan az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel lehet meghatározni, míg a Western blot módszer segítségével fehérjék méretére, variánsok vagy poszttranszlációs módosulások jelenléte határozható meg. Ha azonban a fehérje szövetbeli kifejeződésére vagyunk kíváncsiak, az immunhisztokémia módszerét alkalmazhatjuk. Az alapfolyamat a szövetminták fixálását, beágyazását, metszését, majd a metszetekben lévő antigének feltárását, endogén peroxidázok gátlását és a nem specifikus kötődések blokkolását foglalja magában. Ezután az adott antigénre specifikus ellenanyaggal való inkubálás során megtörténik az antitest-antigén kapcsolódásán alapuló immunreakció. A jel detektálása szempontjából megkülönböztetünk közvetlenül jelölt elsődleges ellenanyagokat és az elsődleges antitestre specifikus jelölt másodlagos ellenanyagokat (indirekt jelölés). Az ellenanyagok egy adott epitópra (monoklonális antitest), vagy több epitópra lehetnek specifikusak (poliklonális antitest).

A standardizálás elősegítése érdekében - ahogy a szövettani metszetek vizsgálata során általánosan-, az immunhisztokémiai festések során is hasznos az ún. szöveti microarray (Tissue MicroArray – TMA) technika alkalmazása. A módszer lényege, hogy egy adott tárgylemezen nem csupán egy, hanem egyszerre több szövetblokkból származó minta reprezentatív régiójának metszete helyezkedik el. Ehhez több donor szöveti blokkból egy speciális TMA készítő készülékben kiválasztott területekről egy-egy meghatározott méretű (0,5 mm, 1 mm vagy 2 mm átmérőjű) szöveti hengert emelünk ki, majd ezt egy fogadó paraffin blokkba illesztjük (9. ábra). Az összeillesztés után létrejövő szöveti

microarray (TMA) blokkból készült metszeteken azonos kísérleti körülmények közt, jelentős reagens megtakarítás mellett végrehajtott kísérletek során számos szövetminta vizsgálható.



9. ábra: A szöveti microarray (TMA) A) készítésének szemléltetése, valamint B) egy hematoxin-eozin festett TMA metszet digitalizált tárgylemezének részlete. Az ábra a <https://medicine.yale.edu/pathology/research/tissueservices/tissuemicroarrayfacility/what.aspx> weboldalon található ábra alapján, módosítva készült.

Az immunhisztokémiai reakció után a kiértékelést hagyományos mikroszkóppal illetve digitális mikroszkóppal is végezhetjük. A digitalizálási folyamat során egy nagy felbontású szkennert segítségével rögzítik a tárgylemez képét, amely elemzésére speciális szoftverek és algoritmusok használatával van lehetőség. A módszer előnye, hogy a létrejövő jel minősége állandó marad. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése leggyakrabban szemi-kvantitatív módszerekkel, részben szubjektív módon történhet, így az eredmények interpretálása a módszer kritikus része. A klasszikus értékelés egy relatív skálán történik a festődés intenzitásától függően (0 ha nincs festődés, +1 gyenge, +2 mérsékelt és +3 erős immunfestődés esetén). Ettől pontosabb értékelési rendszerek is használtak, pl. a Q-score módszer, amely az előbbi skálát használva az adott festődési intenzitású sejtek számával arányosan számolja ki az adott mintában a fehérje kifejeződésének szintjét. A végeredmény egy számérték, amely a pozitív sejtek számának (P) és a festődés intenzitásának (I) szorzata: $Q = P \times I$, a szorzat maximális értéke 300.

3 CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám vizsgálati céljait az alábbi pontokban határoztam meg:

1, Friss fagyasztott műtéti és formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) vastagbél szövetmintákból történő automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.

2, Munkacsoportunk által publikált, friss fagyasztott vastagbél szövetminták teljes genomszintű génexpressziós vizsgálata során azonosított, a diagnosztikai csoportokat elkülönítő transzkriptum szett FFPE szövetmintákon való vizsgálata.

3, Friss fagyasztott műtéti, biopsziás és FFPE vastagbél szövetmintákból történő automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.

4, A vastagbél-daganatok kialakulása során génexpressziós változást mutató gének azonosítása és lehetséges szabályozási mechanizmusaik (DNS metiláció, miRNS) vizsgálata.

5, A klinikai gyakorlatban is alkalmazott, a vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia során hipermetilálódó *SEPT9* vérplazma marker DNS metilációs vizsgálata vastagbél-szövetből izolált hám és strómasejteken.

4 MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A vizsgált szövetminták

4.1.1 A vizsgált szövetminták összefoglalása

4. táblázat. Vizsgálataink során elemzett szövetminta típusok összegzése. CRC = vastagbél-daganat, AD = adenoma, NAT = normál adjacens szövet, N = egészséges vastagbél-szövet.

Betegcsoport (mintaszám)	Vizsgálat	CRC (114)	AD (34)	NAT (102)	N (18)	Összesen (268)
1. RNS markerek vizsgálata	1.1. Automatizált RNS izolálás	20	-	20	-	40
	1.2 RT-PCR	30	-	15	15	60
	1.3 in situ RNS hibridizáció	3	3	3	-	9
2. DNS metilációs markerek vizsgálata	2.1. Automatizált DNS izolálás	30	-	30	-	60
	2.2. DNS metilációs vizsgálatok	15	15	15	-	45
	2.3 miRNS vizsgálatok	3	3	3	-	9
	2.4. Immunhisztokémia	10	10	10	-	30
3. SEPT9 metilációs vizsgálata	Szekvenálás és immunhisztokémia	3	3	3+3	3	15

Vizsgálataink során összesen 268 vastagbél szövetminta elemzésére került sor. A mintacsoportban 114 CRC, 34 adenoma, 107 tumor melletti ép szövet (NAT – normal

tissue adjacent to tumor) és 18 egészséges vastagbél szövetminta volt. A különböző vizsgálatokba bevont mintatípusok összefoglalása a 4. táblázatban található.

4.1.2 A vizsgált szövetminták feldolgozása

4.1.2.1. Friss fagyasztott minták

Sebészileg eltávolított vastagbél-daganatokból és az eltávolított rezekált colonvég makroszkóposan ép (NAT) területekről származó szövetminták az eltávolítást követő rövid időn belül fagyasztásra kerültek folyékony nitrogén felhasználásával, majd a fenti friss fagyasztott szövetmintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk. Egyik mintacsoport sem tartalmazott olyan mintát, ahol a beteg a mintavétel időpontja előtt kemo- vagy radioterápiás kezelésben részesült. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot gyűjtöttünk, a mintagyűjtéshez szükséges etikai engedélyt (TUKEB 2005/037 és TUKEB 23970/2011) a regionális etikai bizottság megadta.

4.1.2.2 Biopsziás minták

A biopsziás mintákat (kb. 3-5 mg szövet) rutin szűrési célból végrehajtott kolonoszkópiás vizsgálat során gyűjtöttük, rögtön RNALater (Qiagen, Hilden, Németország) nukleinsav stabilizáló anyagba helyeztük, majd felhasználásig -80°C -on tároltuk őket. Egyik mintacsoport sem tartalmazott olyan mintát, ahol a beteg a mintavétel időpontja előtt kemo- vagy radioterápiás kezelésben részesült. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot gyűjtöttünk, a mintagyűjtéshez szükséges etikai engedélyt (TUKEB 23970/2011) a regionális etikai bizottság megadta.

4.1.2.3 FFPE minták

Az FFPE minták rutin patológiai folyamat szerint 4%-os pufferolt formaldehidben lettek rögzítve (kevesebb, mint 24 órán keresztül). Az általunk felhasznált minták kevesebb, mint 6 hónapos tárolás után lettek a helyi patológiai archivumból kigyűjtve. Egyik mintacsoport sem tartalmazott olyan mintát, ahol a beteg a mintavétel időpontja előtt kemo- vagy radioterápiás kezelésben részesült. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot gyűjtöttünk, a mintagyűjtéshez szükséges etikai engedélyt (ETT-TUKEB 23970/2011) a regionális etikai bizottság megadta.

4.2 Vastagbélrákra jellemző mRNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon

4.2.1 Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

4.2.1.1 Mintagyűjtés

A 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT friss fagyasztott szövetminta a 4.1.2.1 fejezetben, valamint ugyanazon biológiai szövetekből készített 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT FFPE minta gyűjtése a 4.1.2.3 fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatba bevont szövetminták adatait az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: Az automatizált RNS izolálás alkalmazhatósági vizsgálatba bevont szövetminták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	NAT	CRC	
		Dukes B*	Dukes C*
Friss fagyasztott / FFPE			
Esetszám	10	6	4
Nő/Férfi	4/6	3/3	3/1
Átlag életkor (év)	74,7 ± 6,7	75,7 ± 3,1	73,2 ± 10,7

4.2.1.2 Automatizált és manuális RNS izolálás

Friss fagyasztott minták tömegének (20 mg szövet) lemérése után minden mintát egyenként MagNA Lyser Green Beads (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) kerámia gyöngyöket tartalmazó centrifuga csövekbe helyeztünk, majd 800 µl MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffert adtunk hozzá. A szövetek homogenizálását 6500 rpm sebességgel 50 másodpercen keresztül, kétszer ismételve a MagNA Lyser (Roche Applied Science) homogenizátor segítségével végeztük. Az FFPE mintákat metszést követően centrifugacsövekbe helyeztük, majd 2 x 10 perces xilolos és 2 x 10 perces abszolút etanolos inkubálás után a metszeteket kiszárítottuk. A teljes RNS kivonást manuális és automatizált módszerrel is elvégeztük ugyanazokból a

mintákból. Az automatizált izolálást 350 µl szöveti lizátumból, valamint 1-1 kiszárított FFPE metszetből végeztük az automatizált MagNA Pure 96 Cellular Large Volume Kit (Roche) használatával a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszeren a gyártó előírásainak megfelelően. A friss fagyasztott metszeteknél a RNA Tissue LV 0.39 elnevezésű gyári protokollt, míg az FFPE minták esetén a RNA FFPE LV 0.21 elnevezésű protokollt használtuk. A manuális kivonást 350 µl szöveti lizátumból az RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország), valamint 1-1 kiszárított FFPE metszetből az RNeasy FFPE kit (Qiagen) használatával végeztük a gyártói utasításokat követve.

4.2.1.3 RNS minták mennyiségi és minőségi ellenőrzése

Az RNS koncentrációt a NanoDrop 1000 spektrofotométer készülékkel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) mértük. Az RNS minőségét az RNA 6000 Pico LabChip kit használatával az Agilent BioAnalyzer 2100 mikrokapilláris elektroforézis rendszeren határoztuk meg. Az RNS minőségét egy 10 (legintaktabb) - 1 (legtöredezettebb) terjedő skálán meghatározott integritási számmal (RIN - RNA Integrity Number) jellemeztük.

4.2.2 Vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon

4.2.2.1 Mintagyűjtés

A 15 CRC és a hozzátartozó 15 egészséges vastagbél biopszia a 4.1.2.2 fejezetben, valamint 15 CRC és a hozzátartozó 15 NAT FFPE minta gyűjtése a 4.1.2.3 fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatba bevont szövetminták adatait az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálatába bevont minták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	NAT/ Normál	CRC			
		Dukes B*	Dukes C*	Dukes D*	Besorolás nélkül
Biopszia					
Esetszám	15	2	4	6	3
Nő/Férfi	11/4	1/1	4/0	3/3	1/2
Átlag életkor (év)	53,0 ± 15,0	73,0 ± 9,9	62,5 ± 11,0	68,0 ± 16,7	75,3 ± 11,9
FFPE					
Esetszám	15	11	4	-	-
Nő/Férfi	6/9	5/6	1/3	-	-
Átlag életkor (év)	66,5 ± 10,9	68,3 ± 9,6	61,5 ± 14,3	-	-

Az in situ hibridizációs kísérletekhez 3 NAT, 3 adenoma és 3 CRC szövetmintákat a 4.1.2.3 fejezetben leírtak szerint gyűjtöttük (7. táblázat).

7. táblázat: Az in situ mRNS hibridizáció vizsgálatba bevont vizsgált minták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	NAT	Adenoma		CRC
		tubuláris	tubulovillózus	Dukes C*
FFPE	3	2	1	3
Nő/férfi	1/2	1/1	0/1	1/2
Átlag életkor (év)	73 ± 2	72 ± 1,4	75	73 ± 2

4.2.2.2 Automatizált RNS izolálás

A biopsziás mintákat RNALater-ben jégen kiolvastottuk, majd új MagNALyser Green Bead kerámia gyöngyökkel töltött, 800 µl MagNA Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer-t (Roche Applied Science) tartalmazó csövekbe helyeztük. A szövethomogenizálást 6500 rpm sebességgel végeztük 50 másodpercen keresztül, kétszer ismételve. Az FFPE metszeteket metszés után centrifugacsövekbe helyeztük, majd 2 x 10 perc xilolos és 2 x 10 perces abszolút etanolos inkubálás után kiszárítottuk. A teljes RNS izolálást 350µl biopsziás szöveti lizátumból illetve 1-1 kiszárított FFPE metszetből végeztük automatizált MagNA Pure 96 Cellular Large Volume Kit (Roche) használatával a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszeren a gyártói utasításoknak megfelelően. A biopsziás mintákból történő RNS kivonáshoz az RNA Tissue LV 0.39 elnevezésű gyári protokollt, míg az FFPE minták esetén a RNA FFPE LV 0.21 elnevezésű protokollt használtuk.

4.2.2.3 Mennyiségi és minőségi ellenőrzés

Az RNS minták mennyiségi és minőségi ellenőrzését a 4.1.3 pontban leírtaknak megfelelően végeztük.

4.2.2.4 Valós-idejű polimeráz láncreakció

A reverz transzkripciót 150 ng teljes RNS-ből végeztük a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Németország) segítségével anchored oligo (dT) és random hexamer primerek kombinációjának használatával. A 11, korábbi microarray vizsgálataink során azonosított CRC-specifikus transzkriptum (*CA7*, *COL12A1*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CHI3L1*, *GREM1*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL8*, *MMP3*, *SLC5A7*) expressziós elemzését valós-idejű PCR módszerrel végeztük el a *18S* riboszómális RNS belső kontroll alkalmazásával (8. táblázat). A reakcióhoz RealTime Ready® próbákat (forward és reverz primer 400 nM, fluoreszcensen jelölt hidrolízis próba 200 nM, Roche Applied Science) használtunk. A valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakciót 10 µl végtérfogatban 5 ng/minta cDNS-ből kiviteleztük, 5 µl LightCycler Probes Master és a próbák hozzáadásával. A reakciók összeállítását epMotion 5070 folyadékkezelő automata (Eppendorf) segítségével végeztük. A LightCycler® 480 RT-PCR készüléken (Roche) a következő hőciklust használtuk: 95°C 10 perc enzim aktiváció és denaturáció, 45 amplifikációs cikluson keresztül 95°C 10 perc, 60°C 30 másodperc annealáció és

lánchosszabbítás és 72°C 1 másodperc jeldetektálás, majd 40°C 30 másodperces hűtésen keresztül. A nyers Cp (crossing point) értékeket a 18S referencia (housekeeping) gén adataival normalizáltuk.

A receiving operating characteristic (ROC) görbe elemzéshez a MedCalc 13.3 szoftvert használtuk annak érdekében, hogy a vizsgált markerek elkülönítő képességét megállapítsuk. Az elkülönítő képességet jellemző specificitás és szenzitivitás értékeket interaktív dot diagramokon ábráztuk. A diszkriminációs elemzést SPSS 22.0 szoftver segítségével végeztük.

8. táblázat: A CRC-specifikus transzkriptumcsoport vizsgálatára alkalmazott assay-k.

Génszimbólum	Gén név	Amplikon hossz	RealTime ready Assay azonosító szám (Roche)
CA7	karbon-anhidráz VII	77	103015
CHI3L1	kitináz 3-szerű fehérje 1	76	103035
COL12A1	kollagén XII, alfa 1	66	103045
CXCL1	kemokin (C-X-C motívum) ligandum 1	105	105522
CXCL2	kemokin (C-X-C motívum) ligandum 2	95	103070
GREM1	gremlin 1	111	103109
IL1B	interleukin 1, beta	87	100950
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonista	76	103133
IL8	interleukin 8	92	103136
MMP3	mátrix metallopeptidáz 3	110	103167
SLC7A5	SLC 7. család 5. tagja	72	103210
RN18S1	18S riboszómális RNS	73	104092

4.2.2.5 *In situ* RNS hibridizáció

Az mRNS *in situ* hibridizációt a 11 marker közül kiválasztott két marker, a csökkenő kifejeződést mutató karbon-anhidráz VII (CA7; NM_005182.2), a vastagbél-daganatokban fokozott expressziójú kemokin (C-X-C motívum) ligandum 1 (CXCL1, NM_001511.2) esetén végeztük el. A vizsgálatot a Bioneer dán cég segítségével végeztük. A vizsgálat során két-két nem átfedő oligonukleotidot terveztünk mindkét célpontra: CA7 mRNS-nél: 5'-TGGCATTCCAGTGAACCAGAT-3' (643-623 nukleotidok) és 5'-AGCGCATCTGTCAGACGATTCAT-3' (758-736 nukleotidok), és a CXCL1 mRNS esetén: 5'-ATGCAGGATTGAGGCAAGCTTT-3' (347-326 nukleotidok) és 5'-TTGGATTTGTCACTGTTTCAGCAT-3' (399-377 nukleotidok). A reakciók kimutatásához ún. lakatolt/kötött nukleinsav (Locked nucleic acid – LNA) oligonukleotidokat használtunk, amelyek olvadáspontjai (melting temperature; T_m) sorrendben a következők voltak: 87°C, 84°C, 85°C és 86°C. Emellett negatív és pozitív kontroll próbát is alkalmaztunk. A negatív kontroll próba egy 22 oligonukleotidból álló LNA oligonukleotid volt (T_m= 87°C), a pozitív próba egy 21 nukleotidból álló, miR-126-ra tervezett, korábban publikált LNA próba volt (T_m= 84°C) [110]. Az 5' és a 3' végeken 6-karboxifluoreszcein (FAM)-nel jelölt (dupla-FAM jelölt próbákat), az Exiqon cégtől rendeltük (Vedbæk, Dánia). Az *in situ* hibridizációt Tecan Genepaint készülékben végeztük (Tecan, Männedorf, Svájc) a korábbi leírásoknak megfelelően [110]. Az FFPE blokkokból készített 6 µm vastag metszeteket deparaffináltunk, majd proteináz K enzimmel (25 µg/ml) inkubáltuk 8 percen keresztül 37°C-on. Az *in situ* hibridizációhoz az egy adott génhez tartozó próbák elegyét (60 nM) az Exiqon hibridizációs pufferében oldottuk fel (Exiqon), majd 57°C-on egy órán keresztül inkubáltuk. Emellett egy-egy párhuzamos metszeten elvégeztük a pozitív (30 nM) és negatív (60 nM) próbák hibridizálását is. SSC pufferekben történő öblítési lépések után a metszeteket alkalikus-foszfáttal konjugált anti-FAM (1:800, Roche, Mannheim, Németország) ellenanyaggal inkubáltuk. A metszeteket 4-nitro-blue tetrazolium (NBT) reagenssel és 5-bróm-4-kloro-3'-indolil-foszfát (BCIP) szubsztráttal (Roche) kezeltük 90 percen keresztül, míg a jelölt nukleinsavak területén sötétkék csapadék keletkezett. A metszeteket Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Burlingame, USA) festékkel kontrasztfestettük. A jelölt metszeteket digitális szkenneléssel rögzítettük (Pannoramic 250 szkennel, 3DHISTECH Kft., 20x objektív).

4.3 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetminták vizsgálata során

4.3.1 Automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

4.3.1.1 Mintagyűjtés

A 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT friss fagyasztott szövetminta a 4.1.2.1 fejezetben, 10 CRC és 10 egészséges vastagbél biopszia a 4.1.2.2 fejezetben, valamint 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT FFPE minta gyűjtése a 4.1.2.3 fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatba bevont szövetminták adatait az 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: Az automatizált DNS izolálás alkalmazásának vizsgálata során használt minták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	NAT/Normál	CRC		
		Dukes B*	Dukes C*	Dukes D*
Friss fagyasztott				
Esetszám	10	7	3	-
Nő/Férfi	6/4	3/4	3/0	-
Átlag életkor (év)	70,5 ± 11,7	67,7 ± 12,31	77,1 ± 8,5	-
Biopszia				
Esetszám	10	4	3	3
Nő/Férfi	6/4	2/2	1/2	2/1
Átlag életkor (év)	50,2 ± 12,6	63,8 ± 8,8	68,3 ± 13,2	55,0 ± 25,5
FFPE				
Esetszám	10	6	4	-
Nő/Férfi	4/6	3/3	1/3	-
Átlag életkor (év)	67,4 ± 13,3	66,0 ± 14,4	69,5 ± 13,1	-

4.3.1.2 Automatizált és manuális DNS izolálás

Friss fagyasztott minták tömegének (3-5 mg szövet) lemérése után minden mintát egyenként centrifuga csövekbe helyeztünk, majd 180 µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer-t (Roche, Cat no: 04 805 160 001) mértünk rájuk, ezután 20 µl proteináz K enzimet (Roche, Cat. no. 03 115 828 001) adtunk az elegyhez az automatikus izolálás előtt. A manuális izolálás során a szövetmintákat 180 µl ATL és 20 µl proteinase K (mindkettő a QIAamp DNA Mini Kit része) elegyébe helyeztük. Erőteljes keverés után minden mintát 55°C-on emésztettünk 4 órán keresztül. A DNS izolálást a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük a MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit felhasználásával, a DNA Tissue SV 2.0 protokoll szerint. A manuális DNS kivonás a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) használatával, a gyártói utasításoknak megfelelően történt. Az elúciós térfogat mindkét protokoll esetén 200 µl volt.

Az RNALaterben tárolt biopsziás mintákat jégen olvasztottuk ki, majd a szövetmintát egy új centrifugacsőbe helyeztük át, amely 180 µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer-t és 20 µl proteinase K enzimet tartalmazott. Erőteljes keverés után a szövetmintákat 55°C-on emésztettünk 4 órán keresztül. A szövetkeverékek enzimátikus kezelése után 100 µl-enként új csövekbe mértük, majd az automata izolálás előtt még további 100 µl lízis pufferrel (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer), a manuális izolálás előtt 100 µl ATL pufferrel egészítettük ki. A DNS izolálást a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük a MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit felhasználásával, a DNA Tissue SV 2.0 protokoll szerint. A manuális izolálást QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) alkalmazásával végeztük. Az elúciós térfogat mindkét protokoll esetén 50 µl volt.

Az FFPE blokkokból 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd ezeket centrifugacsövekbe helyeztük. A deparaffináláshoz 2 x 10 perces xilolos inkubációt, majd 2 x 10 perces abszolút etanolos inkubációt használtunk. A metszeteket kiszáritás után új centrifugacsövekbe helyeztük, az automata izolálás előtt 200 µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer-t és 20 µl proteináz K enzimet adtunk a metszetekhez, a manuális izolálás esetén 180 µl ATL Buffer-t és 20 µl proteinase K enzimet. Erőteljes keverés után a szövetmintákat 55°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül az automatikus izolálás előtt, és 56°C-on 2 óráig a manuális izolálást megelőzően. A DNS

izolálást a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük a MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit felhasználásával, a DNA FFPE SV 2.0 protokoll szerint. A manuális izolálást QIAamp DNA FFPE Kit (Qiagen) alkalmazásával végeztük.

4.3.1.3 Mennyiségi és minőségi ellenőrzés

Az izolált DNS mennyiségét (OD260) NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo-Fischer) segítségével határoztuk meg. A tisztaság meghatározása érdekében OD260/280 és OD260/230 arányokat is meghatároztuk, előbbiről a fehérje szennyezettségre, utóbbiból a szerves oldószerek, sók általi szennyezettségre lehet következtetni. A kivont DNS fragmentáltságát egy már korábban leírt módszer [111] segítségével ellenőriztük; amelyhez *GAPDH* gén 4 különböző hosszúságú (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp) szakaszát felszaporító multiplex PCR segítségével. A reakcióban mintánként 8 ng DNS-t használtunk, *GAPDH* multiplex primert (0,133 μ M végkoncentráció) és LightCycler 480 Probes Master (2x) reagenst adtunk. A PCR amplifikációt LightCycler 480 készülékkel, MonoColor Hydrolysis Probe/UPL Probe detektálás alkalmazásával a következő hőciklus szerint végeztük: kezdeti denaturáció: 95°C 10 perc, 45 ciklus amplifikáció: 95°C 10 s, 60°C 30 s, 72°C 16 s, majd hűtés 40°C 10 s. A polimeráz lánreakció során felszaporított ampliconokat 2%-os agaróz gélelektroforézis segítségével vizualizáltuk SYBRSafe DNA Gel Stain (Life Technologies, Calrsbad, CA) és Molecular Weight Marker VIII (19-1114 bp) marker használatával.

10. táblázat: A DNS metilációs vizsgálatok során tanulmányozott gének, primer szekvenciái, az ampliconok lokalizációja és hossza.

Gén	Primer szekvencia /forward (F) és reverz (R)/	Amplikon lokalizáció	Amplikon hossz
<i>MAL</i>	F: TGGTGAAGATAGAGAAGTTATTGGGTAGG R: AAAACCCCAAACCACTAAACTC	Chr 2: 95691438- 95691598	160 bp
<i>SFRP1</i>	F: GGAAAGAGATAAGGGGAGAAAAAGAA R: ATTTCAATAATTTACAAATATAATCCAACTCC	Chr 8: 41167194- 41167333	139 bp
<i>SFRP2</i>	F: GGTAAAGATAGGTTTAATTGATTATTGGGGAATAG R: TAAACACCAATATCCCATCCCT	Chr 4: 154712515- 154712634	119 bp

4.3.1.4 BS-PCR és MS-HRM

Az izolált DNS minták (és a standard minták) DNS metilációs vizsgálata előtt EZ DNA Methylation kit (Zymo Research) segítségével konvertáltuk a mintákat 1 µg input DNS mennyiséggel. Ezután biszulfid-specifikus polimeráz láncreakciót (BS-PCR), majd ezt követően metiláció-specifikus nagy felbontású olvadáspont elemzést (MS-HRM) alkalmaztunk. A primerek szekvenciáit úgy terveztük meg, hogy ne essenek CpG dinukleotidokat tartalmazó szakaszra, így a metilációs státusz ne befolyásolja a primerek biszulfid konverzió utáni templáthoz való kapcsolódását (10. táblázat).

A BS-PCR reakciókat 10 ng/reakció biszulfid konvertált DNS-en 15 µl végtérfogóban kiviteleztek AmpliTaq Gold 360 mastermix (2x) (Life Technologies), LightCycler 480 ResoLight Dye (40x) (Roche Applied Science), forward és reverz primer mix (200nM végkoncentrációban). Három különböző gén (MAL, SFRP1, SFRP2) metilációs vizsgálatát végeztük, a MgCl₂ koncentráció a MAL és SFRP1 esetén 2.0 mM, a SFRP2 esetén 1.5 mM volt. A PCR-t LightCycler 480 PCR készülékkel SYBR Green I/HRM detektálást használatával végeztük a következő hőciklus szerint: kezdeti denaturáció: 95°C 10 perc, 10 touchdown ciklus: 95°C 30 s, 60°C 0,4°C csökkenés/ciklus 30 s, 72°C 30s; 40 ciklus amplifikáció: 95°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 16 s. A nagy felbontású olvadáspont elemzés során 95°C-on 1 perc inkubációt követően a mintákat 40°C-ra hűtöttük, majd ezt követően folyamatos detektálás melletti fokozatos melegítés következett 20 mérés/°C felbontással. A Cp értékeket és a HRM adatokat LightCycler szoftver 1.5.0 (Roche) segítségével nyertük ki. A HRM görbék elemzését LightCycler GeneScanning alkalmazásával végeztük. Standard minták ismert metilációs százalékkal (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) szolgálták a mérés kalibrációjára, a biológiai minták metilációs szintjét ezek alapján állapítottuk meg.

4.3.2 Markerek kiválasztása DNS metilációs vizsgálatokra

4.3.2.1 Potenciálisan DNS metiláció által szabályozott gének kiválasztása

A potenciálisan DNS metiláció által szabályozott gének kiválasztása korábban munkacsoportunk által közölt, teljes genomszintű génexpressziós elemzések eredményei alapján történt. A korábbi vizsgálatok során összesen 147 vastagbélbiopsziát (49 ép, 49 adenoma és 49 CRC), lézer mikrodisszekált vastagbél hám- és stroma sejteket (6 ép, 6 adenoma és 6 CRC), valamint 5-aza-2'-deoxicitidin

demetilációs kezelés előtt és után vizsgált HT-29 humán vastagbél adenokarcinoma sejteket elemeztünk. A vizsgálat során teljes RNS izolálás után a génexpressziós profilozást HGU133 Plus 2.0 microarray-n (Affymetrix) végeztünk. Az eredményként kapott nyersadatokat a Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) adatbázisban közzé tettük, ezek az adatok a következő GSE azonosítók segítségével elérhetőek: GSE4183 (53 biopszia), GSE37364 (94 biopszia), GSE15960 (6 egészséges, 6 adenoma és 6 CRC betegből lézer mikrodisszektált vastagbélhámsejtek) és GSE29060 (HT-29 sejt kultúra kísérlet 6 ismétlésben).

A GSE4183, GSE37364 és a GSE15960 azonosítóval rendelkező adatokból bioinformatikai elemzése segítségével meghatároztuk a potenciálisan DNS metiláció által szabályozott géneket. Azokat a transzkriptumokat választottuk ki, amelyek fokozatosan változó kifejeződést mutatnak a humán vastagbél ép-adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során. Ehhez ún. rang korrelációs vizsgálatokat végeztünk, majd Spearman (Rho koefficiens) és Kendall (Tau koefficiens) elemzések eredményei alapján értékeltük a géneket. A kiválasztott gének listáját a 11. táblázat tartalmazza.

A betegcsoportok közti összehasonlítások során a szignifikanciaszintet a kis mintaszámra való tekintettel Benjamini-Hochberg módszerrel határoztuk meg.

A DNS metilációs vizsgálatokat megelőzően megállapítottuk, hogy az általunk kiválasztott különböző kifejeződést mutató gének közül melyik rendelkezik CpG-denz régióval, ún. CpG szigettel. Ezekben a régiókban, CG dinukleotidokban elhelyezkedő citozin molekulák lehetnek a DNS metilációs szabályozás célpontjai. CpG sziget predikciót *in silico* a CpG plot program felhasználásával (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) alkalmaztunk. A program által használt CpG sziget definíció a következő: minimum 200 nukleotid hosszú, 10 darab 100 nukleotidos vizsgálati ablakban legalább 50% gyakorisággal megjelenő C és G nukleotidok, legalább 0.6 megfigyelt/várt CpG arány az átlaghoz viszonyítva.

11. táblázat: DNS metilációs elemzés során vizsgált gének.

Gén szimbólum	Gén név
ALDH1A3	Aldehid-dehidrogenáz 1. család A3 tagja
BCL2	B sejt limfóma 2
CDX1	kaudális-típusú homeobox 1
COL1A2	I-es típusú kollagán alfa 2
CYP27B1	citokrom p450 27. család B alcsalád polipeptid 1
ENTPD5	ektonukleozid trifoszfát difoszfahidroláz 5
FADS1	zsírsav deszaturáz 1
MAL	T-sejt differenciációs fehérje
PRIMA1	prolin-gazdag membrán horgony 1
PTGDR	prostaglandin D2 receptor
PTGS2	prostaglandin-endoperoxid szintáz 2
SFRP1	szekretált frizzled-rokon fehérje 1
SFRP2	szekretált frizzled-rokon fehérje 2
SOCS3	citokin szignál szuppresszor 3
SULF1	szulfatáz 1
SULT1A1	szulfotranszferáz család 1A, 1. tag
THBS2	trombospondin
TIMP1	metallopeptidáz inhibitor 1

4.3.2.2 Mintagyűjtés

A 15 CRC és a hozzátartozó 15 NAT , valamint 15 adenoma friss fagyasztott minta gyűjtése a 4.1.2.1 fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatba bevont szövetminták adatait az 12. táblázat foglalja össze.

12. táblázat: A vastagbélrákra jellemző DNS metilációs markerek vizsgálatában elemzett minták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	NAT	Adenoma		CRC	
		Adenoma tubulare	Adenoma tubulovillosum	Dukes B*	Dukes C*
Esetszám	15	5	5	7	8
Nő/Férfi	9/6	2/3	2/3	4/3	5/3
Átlag életkor (év)	77,5 ± 7,7	65,0 ± 7,6	64,2 ± 8,5	76,9 ± 3,6	78,1 ± 10,3

4.3.2.3 Lézer mikrodisszekció és makrodisszekció

A friss fagyasztott szövetmintákat ún. OCT fagyasztott beágyazó anyagba (Sakura Finetek, Japán) ágyasztuk be, majd -20°C-os kriosztát készülékben 10 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk. A metszeteket PALM Membrane Slide 1.0 PEN (Carl Zeiss, Bernried, Németország) 1 µm vastagságú poli-etilén-naftalát membránnal borított lemezre helyeztük. A felhasználást megelőzően a metszeteket 70% etanolban 5 percre, majd abszolút etanolban 2 percre inkubáltuk, majd krezil violet acetát festékkel festettük (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A vastagbéliszövet metszeteiről az epitheliális és stromális (megközelítőleg 10³ sejt/minta) sejteket vágtuk körbe, majd egy PALM Microbeam lézer mikrodisszektor segítségével katapultáltuk egy gyűjtőcsőbe.

A makrodisszekált mintákat fagyasztott metszeteiről gyűjtöttük toluidinkék festés után. A metszeteiről mikroszkópos vizsgálat után a nyálkahártyaréteg sejtjeit egyszerhasználatos tű segítségével összegyűjtöttük majd egy centrifugacsőbe helyeztük.

4.3.2.4 Biszulfid konverzió

A biszulfid konverziót előzetes DNS izolálás nélkül, a gyűjtött sejtekből EZ DNA Methylation Direct Kit használatával (Zymo Research, USA) végeztük a gyártói utasításoknak megfelelően. A proteináz K kezelést 20 µl végtérfogatban, az eluálást 20 µl-ben végeztük.

4.3.2.5 Biszulfít-specifikus polimeráz láncreakció (BS-PCR)

In silico CpG sziget predikciót az EMBOSS CpG Plot nyílt forráskódú algoritmus segítségével végeztünk. A biszulfít-specifikus reakcióhoz használt primereket a PyroMark Assay Design szoftver (SW 2.0, Qiagen) segítségével terveztük, olyan nem-CpG gazdag régiókat választottunk, hogy a primerek kapcsolódását és az amplifikációt a biszulfít konvertált DNS szekvenciája ne befolyásolja. A PCR primerek közül az egyik tag (a reverz vagy a forward primer) biotinilált volt, amely a PyroMark szekvenálás szempontjából volt fontos. A primerek specifikusságát *in silico* ellenőriztük a BiSearch szoftverrel (<http://bisearch.enzim.hu>).

A BS-PCR reakciókat AmpliTaq Gold 360 mastermix (2x) (Life Technologies), LightCycler 480 ResoLight Dye (40x) (Roche Applied Science), forward és reverz primer mix (200 nM végkoncentrációban), 1 ng biszulfít konvertált DNS/reakció 15 µl végtérfogatban. A következő hőciklus szerint inkubáltuk a mintákat egy LightCycler 480 PCR gépben SYBR Green I/HRM detektálást használva: kezdeti denaturáció: 95°C 10 perc, 10 ciklus touchdown ciklus: 95°C 30 s, 60°C 0,4°C csökkenés/ciklus 30 s, 72°C 30 s; 40 ciklus amplifikáció: 95°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 16 s. A nagy felbontású olvadáspont analízis során 95°C 1 perc, lehűtés 40°C-ra, majd ezt követően folyamatos detektálás melletti fokozatos melegítés következett 20 mérés/°C felbontással. A Cp értékek és a HRM adatok a LightCycler szoftver 1.5.0 (Roche) segítségével lettek kinyerve. A HRM görbék elemzését a LightCycler GeneScanning alkalmazásával végeztük. Standard minták ismert metilációs százalékkal (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) szolgálták a mérés kalibrációjára, a biológiai minták metilációs szintjét ezek alapján állapítottuk meg.

A direkt biszulfít szekvenálás bázisonként ad információt egy-egy citozin metilációs állapotáról, így a BS-PCR termékeinek egyik leghatékonyabb vizsgálati módszere. A biszulfít konverzió és a BS-PCR reakciók után a nem metilált citozinok uracillá konvertálódnak, míg a metilált citozinok változatlanul citozinok maradnak. Így a szekvenálás során az amplikonok szekvenciájában a CpG szigetek citozinjában megjelenő citozin/timin arány fogja szolgáltatni a DNS metilációs információt. Vizsgálatunk során két különböző piroszekvenálási technikát is alkalmaztunk, elsőként a rövid (mintegy 60 nukleotid hosszú) leolvasási hosszal rendelkező PyroMark Q24 készüléket, majd később a rendelkezésre álló, hosszú amplikonok (megközelítőleg 400

nukleotid hosszú) leolvasására is alkalmas 454 technológiát alkalmazó GS Junior készüléket.

4.3.2.6 Piro szekvenálás PyroMark Q24 készülékkel

A PyroMark Q24 (Qiagen) készülékkel való szekvenáláshoz PyroMark Gold Q24 reagenseket használtunk (Qiagen) a gyártói utasításoknak megfelelően. A BS-PCR termékekhez Streptavidin borított gyöngyöket (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare, London, Nagy-Britannia) adtunk, amelyek a biotinilált amplikonokhoz kapcsolódtak. Ezután a gyártó által előírt vákumos tisztítóállomás használatával megtisztítottuk az amplikonokat (70% etanol 5 sec, Denaturation Solution 5 sec, Wash Buffer 10 sec) A denaturálás után a Sepharose gyöngyhöz kötött egyszálú templátot kaptunk, amelyeket PyroMark Q24 szekvenáló plate-ekbe helyeztünk. Ezután 25 µl szekvenáló primert (0,3 µM annelláló pufferrel hígítva) adtuk a reakcióhoz, majd a szekvenáló primert 80°C-on 2 percig melegítettük, ezután 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mivel a tervezett amplikonok hossza meghaladta a PyroMark Q24 által egy szekvenálási reakció alatt leolvasható nukleotidok számát, amplikononként két szekvenáló primerrel végeztük az adatgyűjtést [112]. Ehhez az első szekvenálási reakciót követően ismételt denaturálást végeztünk, majd új szekvenáló primert adtunk az amplikonokhoz. A szekvenálást a PyroMark Q24 szoftver v2.0.6 (Qiagen) használatával megtervezett futási file szerint végezte a készülék, amely az enzimek, a nukleotidok és a szubsztrát hozzáadása mellett regisztrálta a fényfelvillanásokat. A nyersadatok elemzését a PyroMark Q24 szoftver segítségével, a CpG analízis módban végeztük.

4.3.2.7 Piro szekvenálás 454 GS Junior készülékkel

A rövid amplikonok könyvtárkészítése és az emulziós PCR során a gyártó által ajánlott "Guidelines for Amplicon Experimental Design" protokollt követtük. Az amplikonok koncentrációját fluorometrián Qubit 1.0 készülékkel mértük a High Sensitivity dsDNA reagent (Life Technologies) használatával. A vizsgálni kívánt régióknak megfelelően minden mintából megszintetizáltuk az amplikonokat, amelyeket a könyvtárkészítés során azonos mennyiségben (ekvimolárisan) kevertünk össze. A könyvtár tisztítását AMPure XP gyöngyökkel (Agencourt, Beckman Coulter Genomics, Pasadena, USA) végeztük a standard gyártói utasítások szerint. Az amplikon könyvtár

minőségét BioAnalyzer 2100 mikrokapilláris elektroforézis rendszerrel, a High Sensitivity DNA Chip segítségével ellenőriztük. Az ampliconok fragmentvég javítását (fragment end repair) a GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Rapid Library Preparation Method Manual 3.2) felhasználásával végeztük. A rendszer nagy kapacitása miatt a szekvenálás során egyszerre több minta több ampliconja is vizsgálható, ezért vizsgálataink során 8 minta együttes elemzését választottuk. A könyvtárkészítés során minden amplicon végeihez egy-egy egyedi azonosító szekvenciát, ún. molekuláris vonalkódot építettünk a GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Rapid Library Preparation Method Manual 3.4) használatával. Ezek olyan rövid, egyedi kombinációt tartalmazó mesterséges szekvenciák amely az adatelemzés során a szekvenciák betegenkénti elkülönítésére szolgált. A ligálás utáni tisztítás során az előzőekhez hasonlóan AMPure gyöngyöket használtunk, majd a könyvtár minőségét és a ligálás eredményességét ismét mikrokapilláris elektroforézissel vizsgáltuk. Ezután a különböző betegekhez tartozó mintákat ekvimolárisan összekevertük, majd emulziós PCR-t végeztünk 0,5 molekula/gyöngy aránnyal a Lib-L emPCR kit használatával legalább 80%-ban egyezett az eredmény.

4.3.2.8 miRNS vizsgálat

A mikroRNS vizsgálatokat CRC (n=3), adenomas (n=3) és NAT (n=3) független FFPE mintákon hajtottuk végre. A miRNS izolálást a High Pure miRNA kit (Roche) használatával végeztük, majd közel 800 miRNS kifejeződését a Human Panel I + II (Exiqon) valós idejű polimeráz láncreakción alapuló array segítségével végeztük a miRCURY™ Universal RT microRNA PCR kit használata után, a gyártói utasításoknak megfelelően. A nyers Cp értékeket az ún. platek közti (interplate) kalibrátorral és a minták közti lehető legkisebb szórást mutató miR-423-5p referencia miRNS Cp értékei használatával normalizáltuk. *In silico* miRNS predikciót a miRWALK nevű ingyenes forráskódú adatbázis validált célpontjai közt végeztünk. Ezt követően a kiválasztott miRNS-ek expresszióját hasonlítottuk össze az egészséges, az adenoma és tumoros minták között.

4.3.2.9 Immunohisztokémiai vizsgálatok

Műtétilag eltávolított vastagbéliszövet mintákat gyűjtöttünk a NAT (n=10), adenomákból (n=10) és CRC mintákból (n=10) a rutin patológiában diagnosztizálás

céljából készített FFPE blokkokból. A mintákat szöveti microarray (TMA) metszeteken vizsgáltuk. Négy μm vastag metszeteket készítettünk, majd deparaffinizálás 2 x 2 perc xilolos, majd 2 x 2 perc abszolút etanolos inkubálással zajlott, végül a metszeteket rehidratáltuk. Az SFRP1 immunohisztokémiai festésének antigénfeltáró lépése TRIS EDTA (pH 9.0) pufferben történt mikrohullámú feltárókészülékben 900 W teljesítménnyel 10 percen keresztül, majd 340 W teljesítménnyel 40 percen keresztül. A mintákat anti-SFRP1 poliklonális ellenanyaggal (ab4193, Abcam, Cambridge, Nagy-Britannia) 1:800 hígításban 37°C-on 60 percig inkubáltuk. A vizualizációhoz az EnVision+ HRP rendszert (Labeled Polymer Anti-Mouse, K4001, Dako) és diaminobenzidin-hidrogén peroxidáz-kromogén szubsztrát rendszert használtuk hematoxilin-eozin kontrasztfestés alkalmazása mellett. A metszetek digitalizálásához Panoramic Scanner p250 Flash készüléket használtunk (szoftver verzió 1.11.25.0, 3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország), majd a Panoramic Viewer nevű szoftverrel elemeztük őket (szoftver verzió 1.11.43.0. 3DHISTECH Kft.). A fehérjekifejeződés mértékét az egyes metszeteken az ún. Quick-score (Q) módszerrel értékeltük. Minden egyes TMA szövettani core-t következő módszerrel vizsgáltunk: a pozitív sejtek arányát megszoroztuk az adott intenzitás értékkel (0 ha nincs jel, +1 gyenge jel, +2 mérsékelt és +3 az erős immunfestődés esetén).

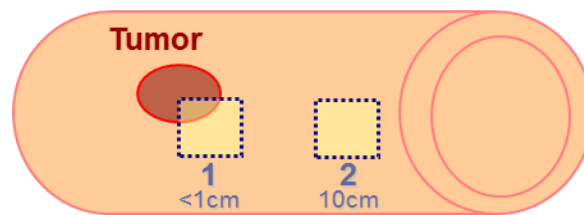
4.4 A *SEPT9* gén DNS metilációs vizsgálata lézer mikrodisszekált hám és stromális sejtekben

4.4.1 Mintagyűjtés

A 3 CRC és a hozzátartozó 3 NAT friss fagyasztott szövetminta a 4.1.2.1 fejezetben, 3 egészséges vastagbél biopszia gyűjtése a 4.1.2.2 fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatban normál adjacens területeket is vizsgáltunk a tumortól két különböző távolságról vett szövetmintákon (NAT1= a tumortól maximum 1 cm-re lévő szövet, NAT2= a tumortól legalább 10 cm-re elhelyezkedő szövetrégió). A vizsgálathoz felhasznált szövetminták adatait az 13. táblázat foglalja össze.

13. táblázat: A *SEPT9* gén metilációs vizsgálata során felhasznált minták. *: Astler-Coller szerint módosítva.

	Normál	NAT 1/2	Adenoma		CRC	
			Adenoma tubuláris	Adenoma tubulovillózus	Dukes B*	Dukes C*
Esetszám	3	3	1	2	2	1
Nő/Férfi	2/1	1/2	1/0	1/1	1/1	0/1
Átlag életkor	57±21,8	65,3±10,7	62	73,0±2,8	62,0±12,7	72



10. ábra: A tumor melletti adjacens szövetek (NAT1, NAT2) mintavételezésének módja.

4.4.2 Lézer mikrodisszekció

A fagyasztott és -80°C -on tárolt szövetmintákat fagyasztott (Optimal Cutting Medium) beágyazó anyagba ágyasztuk (Sakura, Hollandia), és -20°C -os kriosztát készülékben 6-8 μm -es metszeteket készítettünk. A szövetmetszeteket 1 mikrométer vastag poli-etilén naftalát membránnal borított (PALM Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Németország) lemezekre helyeztük, majd a felhasználásig -80°C -on tartottuk őket. Az epitheliális és stromális sejtek elkülönítése érdekében lézer mikrodisszekciót alkalmaztunk. A különböző típusú szövetmintákból kb 10^3 sejtet gyűjtöttünk mindkét sejtípusból. A sejtek szeparálásához egy Zeiss inverz mikroszkóphoz csatlakoztatott PALM lézer mikrodisszektor készüléket használtunk, a sejteket egy, a metszet felé

helyezett adhezív felületű kupakba katapultáltuk. A gyűjtött sejteket egy proteináz K tartalmú lízispufferrel erősen összekevertük, majd -80°C -on tároltuk.

4.4.3 Lézer mikrodisszekált sejtek előkezelése

A lízispufferben tárolt sejteket 56°C -on 3 órán keresztül inkubáltuk, majd további friss proteináz K enzim hozzáadása után 16 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. Minden egyes minta lizátumot DNS konverzióknak vetettünk alá, az alkalmazott protokoll szerint előzetes DNS izolálás nélkül. A kis mintamennyiség miatt az EPI proColon 2.0 kit gyártói protokollját módosítottuk, eszerint $45\ \mu\text{l}$ Bisulfite Conversion Reagent oldatot és $10\ \mu\text{l}$ Protection Buffer-t adtunk a mintákhoz. A minták 80°C -on történő 45 perces inkubációját (MJ Research Tetrad, GMI, USA) követően Binding Buffert és poly-dA (Qiagen, Németország) reagenseket adtunk a mintákhoz, majd az elegyet szilikon membránt tartalmazó oszlopra (Zymo Research, USA) mértük. Deszulfonálást $0,2\ \text{M}$ NaOH hozzáadásával végeztünk 2 percig, majd AW1 és AW2 (Qiagen) pufferekkel történő mosást alkalmaztunk. A biszulfít konvertált mintákat $40\ \mu\text{l}$ 50°C -ra előmelegített molekuláris biológiai tisztaságú vízben lettek eluálva, majd a mintákat felhasználásig -20°C on tároltuk. A minták 92%-ában a genomális DNS kevesebb volt 1%-nál, ami magas konverziós arányra utal. Két lézer mikrodisszekált mintában ez az arány 10% feletti volt, de ezeket sem zártuk ki a további vizsgálatokból, hiszen még így is elegendő biszulfít konvertált templátot tartalmaztak az amplifikációhoz és a szekvenáló reakcióhoz.

4.4.4 DNS metilációs vizsgálat

A kis mennyiségű biszulfít konvertált mintákat egy kétlépcsős multiplex amplifikációnak vetettük alá, amely egyszerre 13 régió felszaporítására alkalmas (12. ábra). A reakcióban mintánként $2\ \text{ng}$ biszulfít konvertált DNS-t használtunk. A primerek tervezésénél figyelembe vettük, hogy komplementer szakaszaikban ne legyen CG dinukleotid, így a metilációs státusz ne befolyásolja a primerek biszulfít konverzió utáni templáthoz való kötődését. A PCR reakció első lépésében multiplex pre-amplifikációt végeztünk a 13 primer párral, majd ezt követték a génspecifikus (sPCR) reakciók.



11. ábra: A SEPT9 gén lokalizációjának és genomi szervezetségének illusztrálásához az UCSC genom böngészőt (<http://genome.ucsc.edu>) használtuk. (A) Az ábrázolt genomi régió 300 kb-t jelenít meg, az általunk vizsgált 8 amplikon (fekete területek, 1-8 piros számokkal jelölve) pozícióját is jelöltük. A CpG szigetek jelölése az amplikonok felett található, a génről átíródó transzkripciós variánsok jelölése pedig az amplikonok alatt található. (B) Nagyobb felbontású kép a 6 kb hosszú régióról, amelyen a 4-7. amplikonokat találhatjuk.

A multiplex PCR-t a következő hőciklus szerint végeztük a reakciót: 15 perces denaturáció 95°C-on, majd 20 másodperc 95°C, 45 másodperc 58°C, 30 másodperc 72°C 50 cikluson keresztül. A reakciók specifikussága érdekében a sokszorosítás során magas hőfokot, a megfelelő termékmennyiség elérése érdekében magas ciklusszámot alkalmaztunk. Ezután a gén-specifikus PCR-ek a multiplex PCR-ben használt primer párok forward és reverz oligonukleotidjaival készültek, azzal a különbséggel, hogy itt minden reverz primer az 5' végén tartalmazott egy rövig „tag” szekvenciát (cgtcgtcg). A „tag” 3 CG dinukleotidot tartalmazott, így három metilált citozinnal egyenértékű belső kalibrátorként szolgált. A multiplex PCR reakció 2 µl-es mennyisége szolgált templátként, a PCR során a fent említett hőmérsékleti ciklust használtunk, a reakciók kivitelezése 96-os plate-ekben történt. A keletkező amplikonok szekvenciáját tisztítást követően Sanger szekvenálással elemeztük egy ABI 3730 XL készüléken (LGC Genomics, Berlin, Németország). Az adatelemzés során a kapott nyers eredményeket az EMSE szoftver segítségével értékeltük ki a korábban részletezett módszer szerint [113].

A kiértékelés során az összes elemzett CG dinukleotidban lévő citozin molekulára kaptunk egy metilációs százalékot. A nem metilált citozinok a biszulfít konverzió során zajló deamináció következtében uracillá alakulnak, amely a PCR amplikonokban timinként jelentkezik, míg a metilált citozinok változatlanul C-k maradnak. Így az adott CG dinukleotid metilációs százalékát a C nukleotidok aránya adja az összes C és T nukleotidhoz hasonlítva. Ezután minden amplikonban lévő CG metilációs értékeket átlagoltuk, majd hasonlítottuk össze a különböző mintatípusokban.

CpG dinukleotidok eloszlása	#	Amplikon hossza	CpG-k száma
	Amp 1	158	12
	Amp 2	268	14
	Amp 3	169	6
	Amp 4	207	17
	Amp 5	229	26
	Amp 6	292	19
	Amp 7	200	10
	Amp 8	278	26

12. Ábra: A SEPT9 DNS metilációs vizsgálatához használt amplikonok adatai a CpG dinukleotidok eloszlásával, számával és az amplikonhossz feltüntetésével.

A reakciókban kontrollként mesterségesen metilált és nem metilált DNS minták különböző arányú (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) keverékét használtuk. A 100%-osan metilált DNS mintát humán limfocitákból izolált (Millipore, Németország), a nem metilált DNS-t humán spermából izolált DNS minták szolgáltatták. A metilációs százalékok megállapítása során ezeket a mintákat használtuk kalibrátorként. A statisztikai szignifikancia megállapítására egyutas ANOVA vizsgálatot használtunk.

4.4.5 Immunhisztokémiai vizsgálat

A Septin 9 fehérjeszint kimutatására immunhisztokémiai vizsgálatot is végeztünk, a lézer mikrodisszekcióhoz használt mintacsoport párhuzamos metszetein. A 6 µm-es friss fagyasztott metszeteket 5 percig acetonban fixáltuk, majd 30 percig szárítottuk. Ezután PBS-ben mostuk, majd 10 percen keresztül 1%-os BSA oldattal kezeltük az aspecifikus kötődések blokkolása érdekében. A Septin 9 fehérjére specifikus poliklonális elsődleges ellenanyagot (Abnova PAB4799, Németország) 1:50 hígításban alkalmaztuk 60 percen keresztül 37°C-on, majd újabb PBS mosást követően a metszeteket Alexa Fluor 546 másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 30 percen keresztül 37°C-on. Magfestést Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, USA) alkalmazásával végeztünk 10 másodpercen keresztül. Lefedés és száradás után a metszeteket Panoramic 250 FLASH fluoreszcens szkennelrel digitalizáltuk pco.edge kamerával és 20x nagyítással (PCO AG, Németország). A Septin 9 fehérje relatív szintjét az Alexa Fluor 546 pixelenkénti átlagos fluoreszcencia intenzitásával határoztuk meg a hám és stroma sejtekben (10 terület/hám minta, 4 terület /stroma minta) a Panoramic Viewer Szoftver V1.15 (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) Histoquant felületének használatával. Az adatokat egyutas ANOVA módszerrel elemeztük.

5 EREDMÉNYEK

5.1 A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon

5.1.1 Automatizált RNS izolálás alkalmazásának vizsgálata

5.1.1.1 Az automatizált RNS izolálás összehasonlítása manuális módszerrel

Összesen 20 friss fagyasztott és 20 FFPE metszetből származó automatizált és manuális módszerrel kivont teljes RNS kihozatalát, tisztaságát és intaktságát hasonlítottuk össze egészséges és vastagbél daganatos minták esetén.

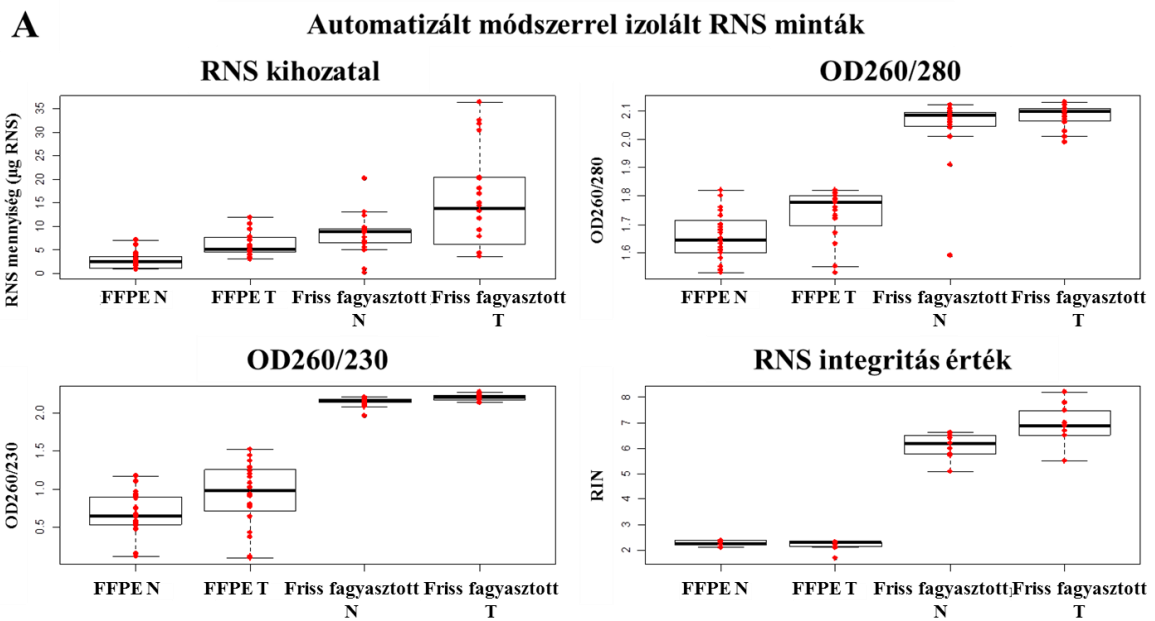
Ugyanazon biológiai mintából származó friss fagyasztott és FFPE mintákból hasonlóan magas RNS kihozatal volt jellemző mind automatizált (átlag \pm szórás RNS mennyiség: friss fagyasztott normális: $8,3 \pm 4,16$ μg RNS; friss fagyasztott CRC: $15,6 \pm 10,28$ μg RNS; FFPE normális: $2,7 \pm 1,7$ μg RNS; FFPE CRC: $6,2 \pm 2,4$ μg RNS), mind manuális izolálás után (átlag \pm szórás RNS mennyiség: friss fagyasztott normális: $7,88 \pm 4,32$ μg RNS; friss fagyasztott CRC: $16,28 \pm 12,38$ μg RNS; FFPE normális: $1,87 \pm 1,55$ μg RNS; FFPE CRC: $2,8 \pm 1,51$ μg RNS).

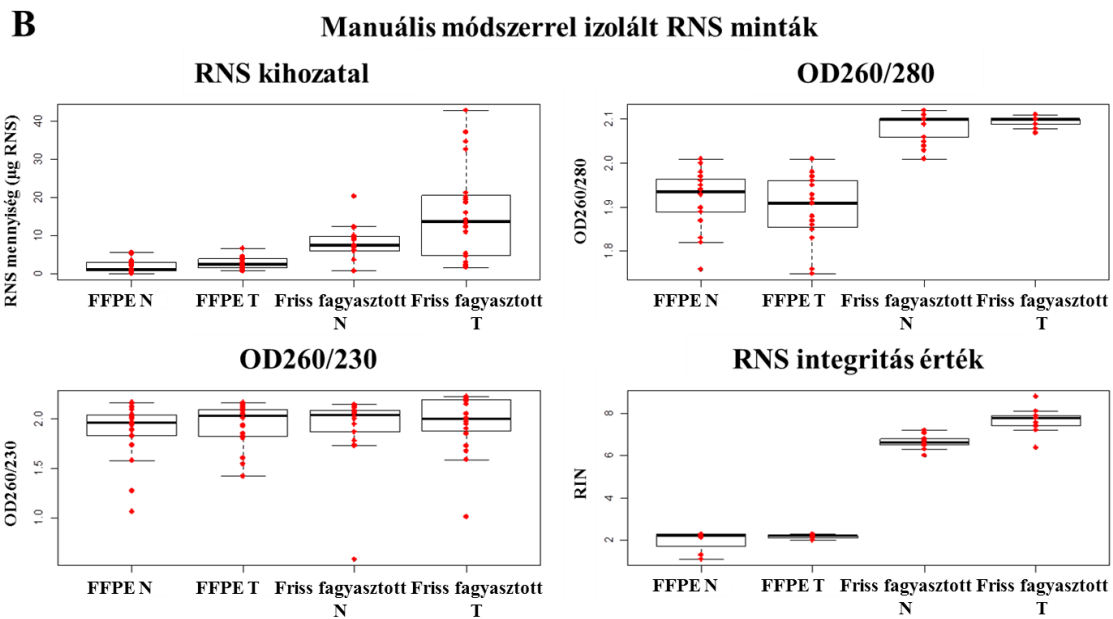
Az izolált RNS minta tisztaságára jellemző OD_{260/280} érték különbözőnek adódtak a két izolálási módszert összehasonlítva. Az automata izolálás során a friss fagyasztott minták értékei a kézi izolálás eredményeihez hasonlóknak bizonyultak, azonban az FFPE minták esetén alacsonyabbnak adódtak (átlag \pm szórás OD_{260/280}: friss fagyasztott normális: $2,04 \pm 0,11$; friss fagyasztott CRC: $2,08 \pm 0,03$; FFPE normális: $1,65 \pm 0,08$; FFPE CRC: $1,74 \pm 0,08$). A kézi izolálású minták OD_{260/280} értékei mindkét mintatípus esetén magasak voltak (átlag \pm szórás OD_{260/280}: friss fagyasztott normál: $1,92 \pm 0,03$; friss fagyasztott CRC: $2,1 \pm 0,01$; FFPE normális: $1,9 \pm 0,06$; FFPE CRC: $1,9 \pm 0,07$).

Az OD_{260/230} értékek az OD_{260/280} értékeknél tapasztalt eltérésekhez hasonló különbséget mutattak a két módszer összehasonlításakor. Az automatizált izolálás után a friss fagyasztott RNS minták OD_{260/230} értékei viszonylag magasak, míg az FFPE minták esetén alacsonyak voltak a kézi izolálás eredményeihez viszonyítva (átlag \pm szórás OD_{260/230}: friss fagyasztott normális: $2,14 \pm 0,05$; friss fagyasztott CRC: $2,2 \pm 0,03$; FFPE normális: $0,67 \pm 0,27$; FFPE CRC: $0,92 \pm 0,42$). A kézi izolálási módszerrel

ez az érték is mindkét mintatípus esetén magasnak bizonyult (átlag \pm szórás OD260/230: friss fagyasztott normális: $1,92 \pm 0,36$; friss fagyasztott CRC: $1,95 \pm 0,30$; FFPE normális: $1,88 \pm 0,21$; FFPE CRC: $1,94 \pm 0,28$).

Az RNS töredezettség mentességét kifejező RIN (10-1) szám az Agilent BioAnalyzer 2100 készülék által a kapott mikrokapilláris elektroferogramon látható 18s és 28s riboszómális RNS-nek megfelelő görbék alatti területek aránya alapján automatikusan generálódik. A skála legnagyobb értéke (10) intakt, míg legkisebb értéke (1) a teljesen lebomlott RNS-re jellemző. Ennek megfelelően a RIN értékek a friss fagyasztott minták esetén magasabbak voltak az FFPE mintákénál mind az automatizáltan (átlag \pm szórás RIN érték: friss fagyasztott normális: $6,1 \pm 0,05$; friss fagyasztott CRC: $6,9 \pm 0,03$; FFPE normál: $2,27 \pm 0,20$; FFPE CRC: $2,18 \pm 0,4$), mind a manuálisan izolált minták esetén (átlag \pm szórás RIN érték: friss fagyasztott normális: $6,6 \pm 0,35$; friss fagyasztott CRC: $7,7 \pm 0,62$; FFPE normális: $1,9 \pm 0,5$; FFPE CRC: $2,1 \pm 0,01$) (13. ábra).





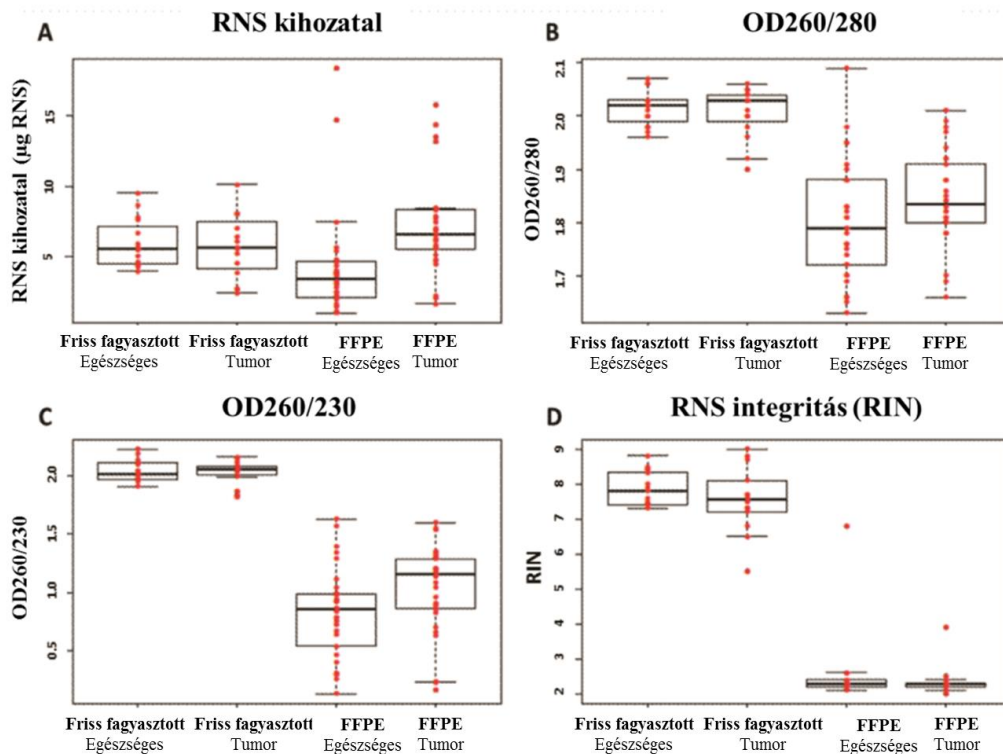
13. ábra: Az automatizált (A) és a manuális (B) módszerrel izolált RNS minták mennyiségi és minőségi jellemzői. A box plot ábrázoláson az egyedi értékek piros pontokkal, a medián értéket vízszintes vonallal és az adatok szórását dobozzal illusztráltuk. (N = normál; T = tumor szövetminta).

5.1.2 A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon

5.1.2.1 Az izolált RNS minták mennyiségi és minőségi adatai

Összesen 30 friss fagyasztott vastagbél biopsziából és 30 FFPE metszetből származó automatizált módszerrel kivont teljes RNS mennyiségi, tisztasági és RNS integritási értékeit hasonlítottuk össze.

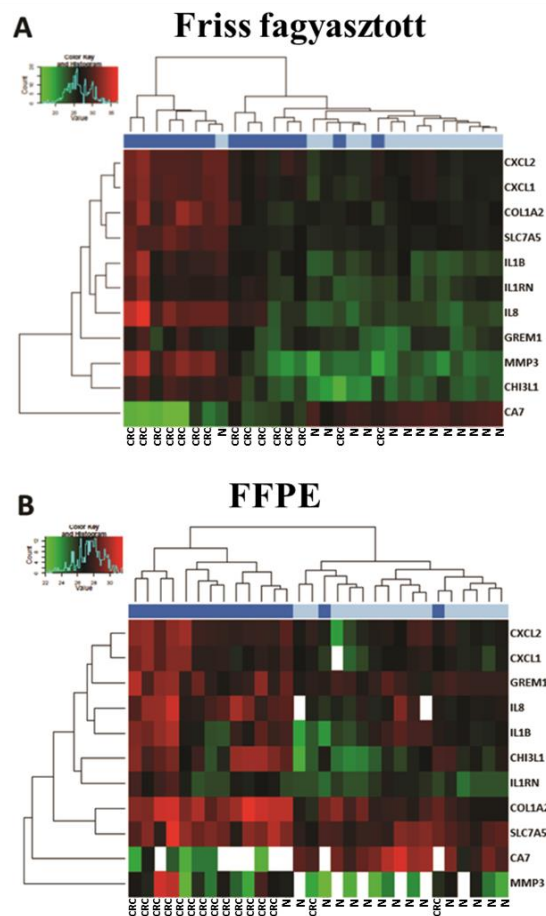
Mindkét szövettípusból nyert RNS mintákra hasonló RNS kihozatal volt jellemző (átlag \pm szórás; biopsziák: normális= $5,98 \pm 1,72$ μg RNS, tumor= $5,77 \pm 2,27$ μg RNS, FFPE: normális = $4,20 \pm 3,70$ μg RNS, tumor= $7,10 \pm 3,30$ μg RNS) (14. ábra). A vártnak megfelelően mind az OD260/280, mind az OD260/230 arányok szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabbak lettek a biopsziákban, mint az FFPE mintákban. A RIN értékek a fagyasztott biopsziákból izolált RNS minták esetén (átlag \pm szórás; normális = $7,87 \pm 0,5$; tumor = $7,55 \pm 0,94$) lényegesen ($p < 0,001$) magasabbnak adódtak, mint az FFPE szövetekből származó RNS mintákban (átlag \pm szórás; normális = $2,60 \pm 1,20$; tumor = $2,40 \pm 0,50$).



14. ábra: Egészséges és tumoros friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákból automatizált módszerrel izolált RNS minták paraméterei. **A)** RNS kihozatal ($\mu\text{g RNS}$), **B)** OD260/280 arány; **C)** OD260/230 arány és **D)** RNS integritás érték (RIN). A box plot ábrázoláson az egyedi értékeket piros pontokkal, a medián értékeket vízszintes vonallal és az adatok szórását dobozzal ábrázoltuk.

5.1.2.2 Génexpressziós vizsgálat

A korábbi vizsgálataink során azonosított 11 CRC-specifikus marker génexpressziós vizsgálatát 30 friss fagyasztott és 30 FFPE mintán végeztük előzetes csoportmegadás nélküli hierarchikus klaszter elemzés (unsupervised hierarchical clustering) eredménye alapján két nagy mintacsoport keletkezett. Az egyik csoportban a CRC minták és egy átsorolódott ép minta, a másikba csaknem az összes ép minta (14/15) és az átsorolódott CRC esetek (8/15) voltak. Az FFPE minták elkülönítése során szintén két nagy csoport alakult ki, majdnem teljesen tökéletesen szétválasztva a CRC és ép eseteket, csak két CRC minta sorolódott át az egészséges csoportba (15. ábra).



15. ábra: A valós-idejű PCR eredményeit ábrázoló hőmérsékleti térkép, amelyen a vizsgált 11 transzkriptum génexpressziós változásai láthatóak a A) friss fagyasztott biopsziákban és az B) FFPE mintákban. A színskála a relatív fokozott expressziótól (piros) a relatív csökkent kifejeződésig (zöld) illusztrálja a tapasztalt változásokat. Sötétkék sáv a tumoros, míg a világoskék sáv az egészséges/NAT mintákat jelöli.

5.1.2.3 A marker csoport elkülönítőképessége friss fagyasztott és FFPE mintákon

A biopsziás minták esetén maximális hatékonysággal sikerült elkülöníteni a mintákat (100%; 100%), míg a (leave-one out módszerrel) keresztvalidált minták esetén a minták 93,3%-a került a megfelelő csoportba (14. táblázat). Az FFPE minták közül 6 ép és 8 tumoros minta automatikusan kizáródott az elemzésből. A maradék 9 ép és 7 tumorminta helyes klasszifikációja maximális volt (100%; 100%).

14. táblázat: Diszkriminancia elemzés a 11 vizsgált transzkriptum kifejeződése alapján
A) friss fagyasztott biopszia és B) FFPE mintákban. A táblázat a becsült csoporthoz való tartozást foglalja össze az eredeti és a keresztvalidált csoportokban.

A

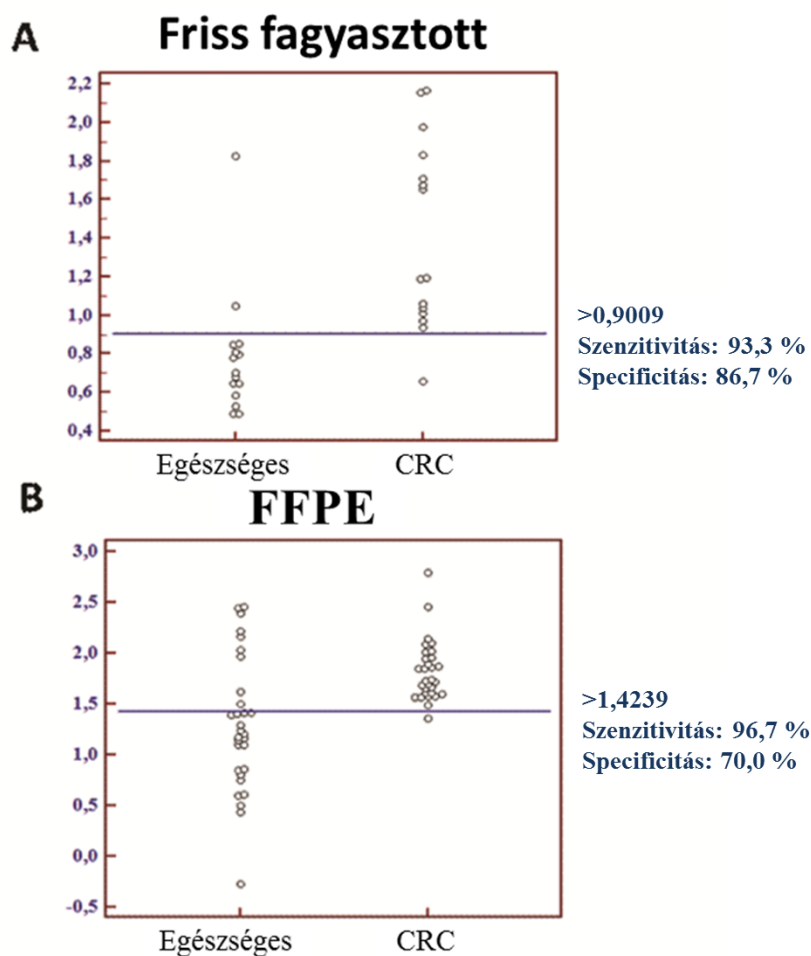
Friss fagyasztott biopszia			Csoportozó tartozás (becslés)		Összesen
		Minták	<i>Egészséges</i>	<i>CRC</i>	
Eredeti	Mennyiség	<i>Egészséges</i>	15	0	15
		<i>CRC</i>	0	15	15
	Százalék	<i>Egészséges</i>	100	0	100
		<i>CRC</i>	0	100	100
Kereszt- validált	Mennyiség	<i>Egészséges</i>	15	0	15
		<i>CRC</i>	2	13	15
	Százalék	<i>Egészséges</i>	100	0	100
		<i>CRC</i>	13,3	86,7	100

B

FFPE			Csoportozó tartozás (becslés)		Összesen
		Minták	<i>Egészséges</i>	<i>CRC</i>	
Eredeti	Mennyiség	<i>Egészséges</i>	9	0	9
		<i>CRC</i>	0	7	7
	Százalék	<i>Egészséges</i>	100	0	100
		<i>CRC</i>	0	100	100
Kereszt- validált	Mennyiség	<i>Egészséges</i>	9	0	9
		<i>CRC</i>	0	7	7
	Százalék	<i>Egészséges</i>	100	0	100
		<i>CRC</i>	0	100	100

5.1.2.4 ROC elemzés

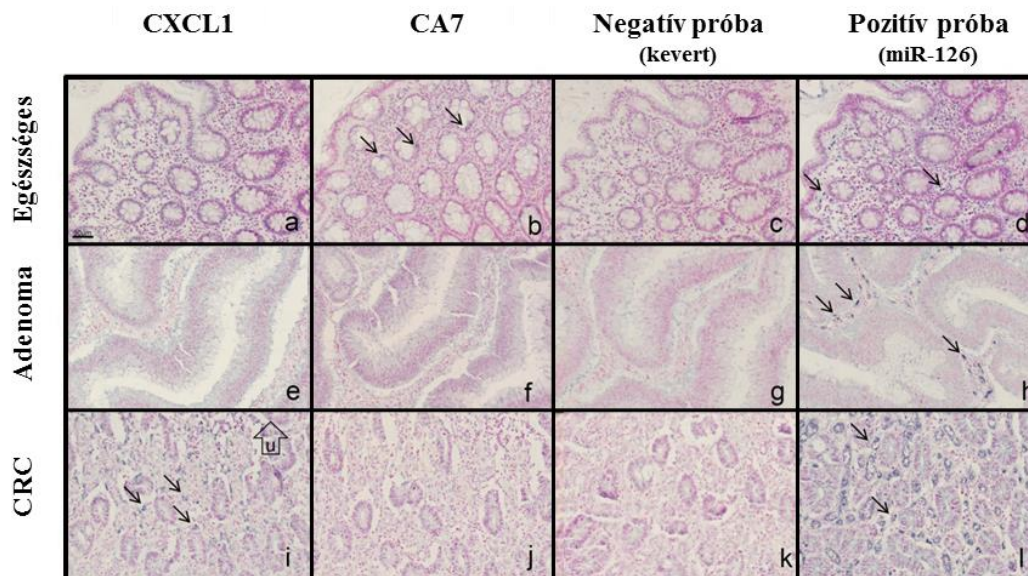
A 11 tagú marker csoport génexpressziós eredményei alapján többszörös logisztikus regresszió segítségével egy egyenletet hoztunk létre, amelyben a különböző markerek eredményei súlyozottan szerepelnek. Az egészséges és tumoros biopsziák 93,3%-os szenzitivitással és 86,7%-os specificitással voltak elkülöníthetők (16. ábra/A). Ezzel szemben az FFPE szöveteket magasabb specificitással (96,7%), de alacsonyabb (70,0%) szenzitivitással tudtuk megkülönböztetni (16. ábra/B).



16. ábra: A) Friss fagyasztott biopsziák és B) FFPE minták elkülönítése a vizsgált 11 marker génexpressziója alapján meghatározott többszörös logisztikus regressziós egyenlet segítségével. Az egészséges és a tumoros minták két külön csoportban ábrázolva láthatóak, amelyet egy vízszintes vonal választ ketté ott, ahol a legnagyobb szenzitivitás és specificitás értékek.

5.1.2.5 *In situ* hibridizáció

Az *in situ* mRNS hibridizációval a karbon-anhidráz 7 és a kemokin ligandum 1 mRNS-ek különböző szövetterületeiken jellemző kifejeződését kívántuk vizsgálni. Elsőként a legyártott próbákat egyenként teszteltük különböző szövettani metszeteken. Génenként 1-1 próba alkalmazásával gyenge diffúz jeleket kaptunk, míg 2-2 próbát alkalmazva jobb jel-zaj arány volt tapasztalható. Három tumoros páciens vastagbél-daganat szövetét és NAT szövetét, valamint három adenoma mintát vizsgáltunk. Mindhárom tumoros mintában azonosítható volt kifelé fordított és invazív front régió is. Gyenge *CA7 in situ* mRNS jelet kaptunk a normális vastagbél-szöveti minták néhány hámsejtjében. Ezzel szemben az adenoma és CRC mintákban a *CA7* mRNS nem volt kimutatható. Mindhárom vastagbél-tumor esetén magas *CXCL1* kifejeződést tapasztaltunk néhány stromális sejtben a tumor kifelé fordított részén. Feltételezhető, hogy az emelkedett *CXCL1* kifejeződést mutató sejtek makrofágok lehetnek. Az adenoma mintákban *CXCL1* jel nem volt kimutatható (17. ábra).



17. ábra: A *CXCL1* és a *CA7 in situ* mRNS hibridizációja. Egészséges (a-d), adenoma (e-h) és CRC (i-l) FFPE metszeteket *CXCL1* és *CA7* transzkriptumokra specifikus LNA próbákkal jelöltünk, emellett negatív kevert és pozitív (miR-126) próbákat is alkalmaztunk. Az *in situ* jeleket nyilak, a CRC minták kifelé fordított régióját U jelölés jelzi. A metszeteket Nuclear Fast Red festékkel kontrasztfestettük. A képeken található jelzés 50 μm -nek felel meg.

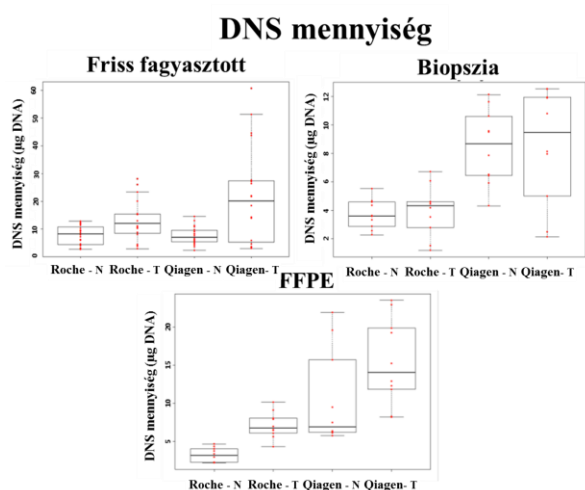
5.2 DNS metilációs markerek vizsgálata vastagbél-daganatokban

5.2.1 Automatizált DNS izolálás alkalmazásának vizsgálata DNS metilációs elemzés során

5.2.1.1 Az izolált DNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése

5.2.1.1.1 Az izolált DNS mennyisége spektrofotometriás adatok alapján

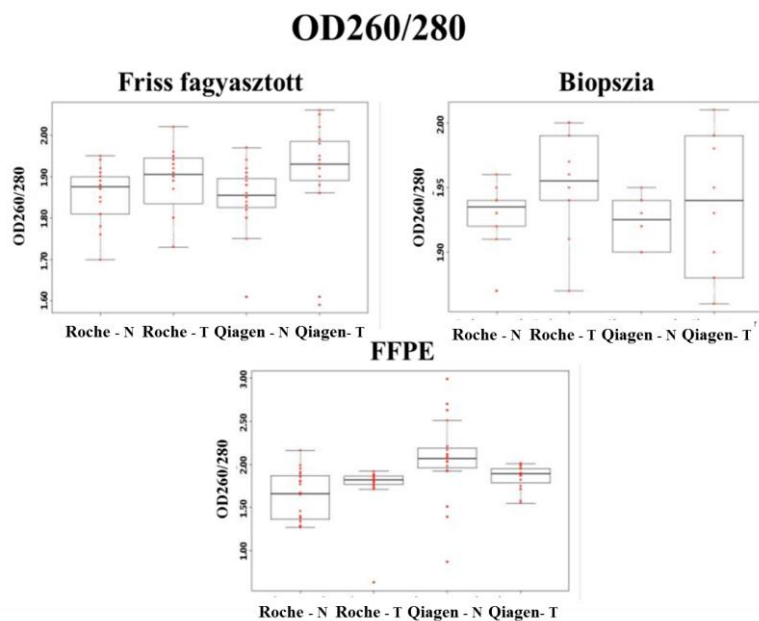
A friss fagyasztott mintákból automatizáltan és kézi módszerrel kivont DNS minták közel azonos mennyiségűnek adódtak. A manuális módszert az automatikus protokollal összevetve, a mennyiségi értékek átlaga nem mutatott jelentős különbséget ($p < 0,01$) (átlag DNS mennyiség \pm SD; automata: $10,48 \pm 6,16 \mu\text{g DNS}$; kézi módszer: $14,61 \pm 14,05 \mu\text{g DNS}$). A biopsziás (átlag DNS mennyiség \pm SD; automata: $3,86 \pm 1,42 \mu\text{g DNS}/3\text{-}5 \text{ mg szövet}$; kézi módszer: $8,50 \pm 3,34 \mu\text{g DNS}/3\text{-}5 \text{ mg szövet}$) és az FFPE minták (átlag DNS mennyiség \pm SD; automata: $4,61 \pm 2,36 \mu\text{g DNS}/\text{metszet}$; kézi módszer: $11,51 \pm 6,89 \mu\text{g DNS}/\text{metszet}$) esetén a manuális módszer szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb DNS mennyiséget eredményezett (18. ábra). A mennyiségi és tisztasági értékek szórása az automatikus izolálás után kisebb volt, amely a daganatos minták esetén volt leginkább jellemző.



18. ábra: Friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákból automata (Roche) és kézi (Qiagen) izolált DNS mennyisége. Minden csoportban 10-10 vizsgált minta volt. A box plot ábrázoláson az egyedi értékeket piros pontok, a medián értékeket vízszintes vonal, az adatok szórását dobozok jelenítik meg.

5.2.1.1.2 OD260/280 arányok

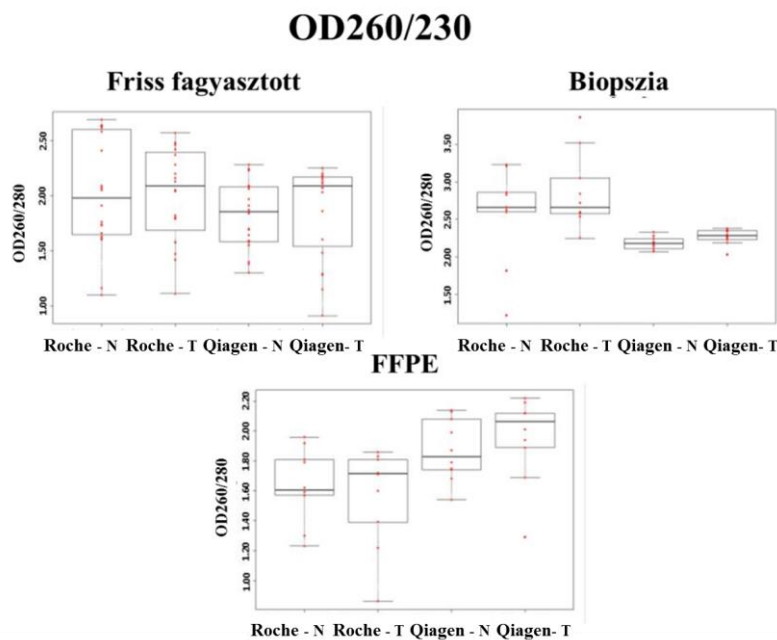
A spektrofotometriásan mért OD260/280 arány alapján a nukleinsav izolátum fehérje tartalmára következtethetünk. Ha az OD260/280 érték 1,8 és 2,0 közé esik, akkor fehérjeszennyezettségtől mentes mintáról beszélünk. Majdnem az összes friss fagyasztott és minden biopszia minta OD260/280 aránya 1,8 felettinek adódott az izolálási módszerektől függetlenül. Az OD260/280 arányok a friss fagyasztott minták (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,87 \pm 0,07$; kézi: $1,88 \pm 0,11$) és a biopsziák (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,94 \pm 0,04$; kézi: $1,93 \pm 0,04$) esetén hasonlóak voltak. Néhány automatikus módszerrel izolált normális FFPE minta OD260/280 aránya a friss fagyasztott és biopsziás mintákénál alacsonyabb volt. A kézi módszerrel izolált OD260/280 aránya szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb volt az FFPE minták esetén (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,83 \pm 0,06$; kézi: $2,00 \pm 0,04$) (19. ábra).



19. ábra: Friss fagyasztott, biopsziás és FFPE mintákból automata (Roche) és kézi (Qiagen) módszerrel izolált DNS OD260/280 aránya. Minden csoportban 10-10 vizsgált minta volt. A box plotokon az egyedi értékeket piros pontokkal, a medián értékeket vízszintes vonallal, az adatok szórását dobozokkal ábrázoltuk.

5.2.1.1.3 OD260/230 arányok

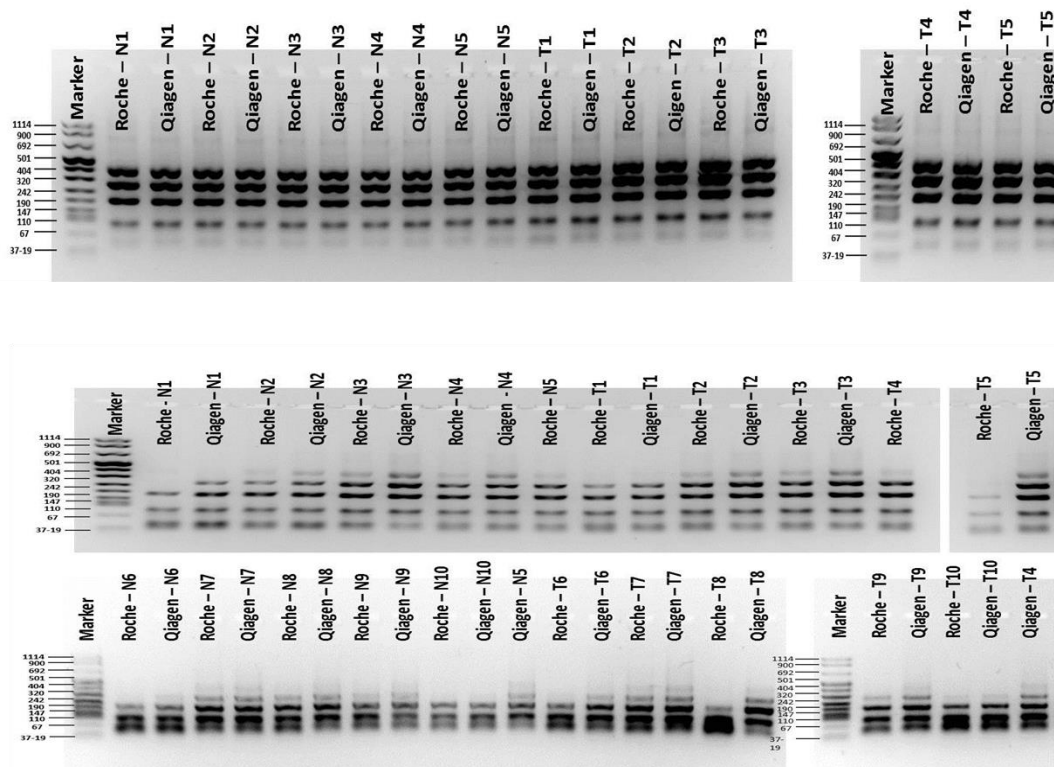
A spektrofotometriásan mért OD260/230 arány alapján a nukleinsav izolátum só és szerves oldószer tartalmára következtethetünk. Ha a fenti érték 2,0 és 2,2 közé esik, akkor tiszta DNS mintáról beszélünk. A friss fagyasztott minták viszonylag magas OD260/230 aránnyal rendelkeztek (átlag OD260/230 \pm SD; automata: 2,01 \pm 0,46; kézi: 1,85 \pm 0,35), ezek az értékek az automatikus izolált mintákban voltak magasabbak. A biopsziás minták esetén megerősítést nyert korábbi megfigyelésünk, vagyis, hogy a kézi izolálás esetén alacsonyabb értékeket kaptunk (átlag OD260/230 \pm SD; automata: 2,71 \pm 0,56; kézi: 2,23 \pm 0,13). Az FFPE minták kézi izolálása után magas OD260/230 arányok voltak mérhetőek, ez a különbség a tumoros minták között szignifikánsnak adódott (átlag OD260/230 \pm SD; automata: 1,81 \pm 0,35; kézi: 1,95 \pm 0,27) (20. ábra).



20. ábra: Friss fagyasztott, biopsziás és FFPE mintákból automata (Roche) és kézi (Qiagen) módszerrel izolált DNS OD260/230 aránya. Minden csoportban 10-10 vizsgált minta volt. A box plot ábrázoláson az egyedi értékek piros pontokkal, a medián érték egy vízszintes vonallal és az adatok szórása dobozzal kerültek megjelenítésre.

5.2.1.1.4 DNS integritás

Pozitív kontrollként friss fagyasztott mintákon is elvégeztük a DNS integritás vizsgálatát, ezekben a mintákban gélelektroforézissel jellemzően mind a négy amplicon kimutatható volt. Az FFPE mintákban ezzel szemben a felszaporítható ampliconok száma eltérő volt az egyes minták és izolálási módszerek között. Ha a két különböző módszerrel, de ugyanabból a biológiai mintából izolált minták eredményeit páronként hasonlítottuk össze, kisebb különbségek adódtak a minták között. Az FFPE csoportban a manuálisan izolált minták 50%-a (10/20) mutatott magasabb DNS integritást, míg az automata módszerrel kivont mintáknak csupán 5%-a (1/20). A vizsgált minták 45%-a (9/20) hasonló DNS integritást mutatott mindkét izolálási módszer után (21. ábra).

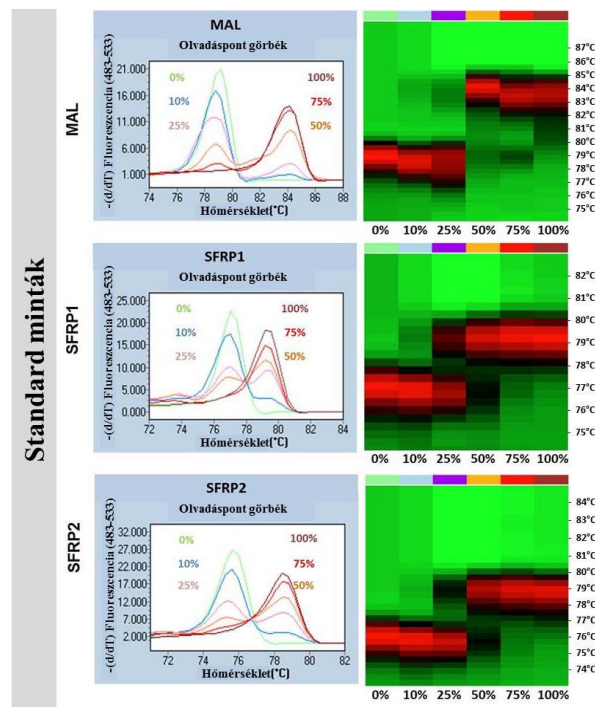


21. ábra: Az FFPE szövetekből izolált DNS minták integritása az automatizált (Roche) és kézi (Qiagen) izolálási módszerek alkalmazása után. A van Beers és mtsai. által korábban leírt protokoll alapján végrehajtott multiplex PCR során a *GAPDH* gén négy különböző hosszúságú szakaszát szaporítottuk fel (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp) [111]. N=normális minta, N1= 1. normális minta, T=tumor minta, T1= 1. tumor minta

5.2.1.2 DNS metilációs vizsgálat

5.2.1.2.1 MS-HRM vizsgálat

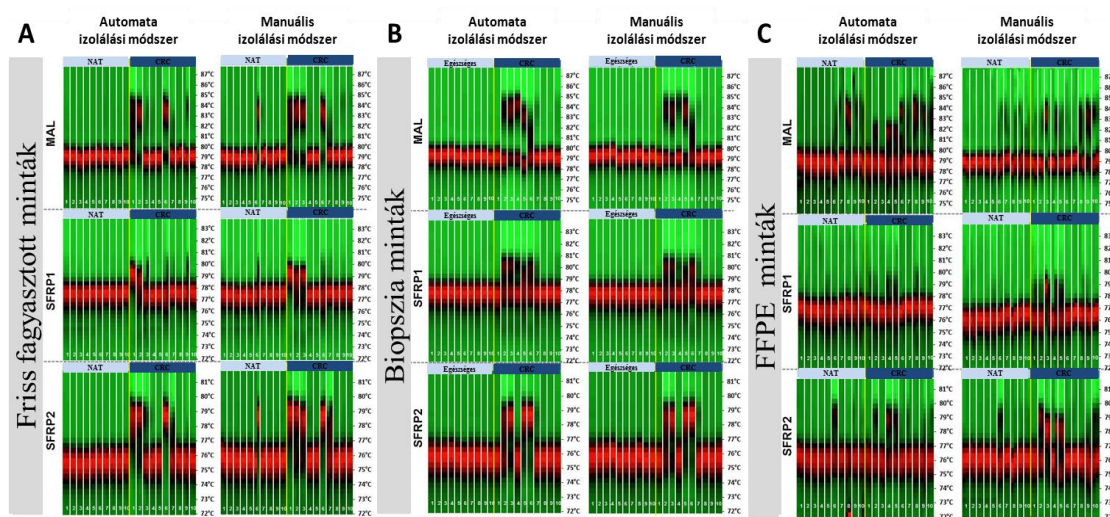
Mesterségesen metilált és nem metilált, kereskedelmi forgalomban kapható (Qiagen Epiect DNA standards) DNS minták különböző arányú keverékével DNS metilációs standard kalibrációs mintákat hoztunk létre, amelyek DNS metilációs eredményeit standard sorként használtuk fel a biológiai minták elemzése során. Az olvadáspont görbe $-dF/dT$ derivált diagram az olvadáspont eredmények általános ábrázolási formája. Ezek az adatok alternatív módon hőmérsékleti térképeken is ábrázolhatóak, ilyenkor a fluoreszcencia intenzitás értékek egy színskálán (zöld: 0% metilált; piros: 100% metilált) mátrix rendszerben ábrázolhatóak, ahol minden oszlop egy-egy mintát, minden sor egy-egy adott hőfokon mért intenzitásértéket jelent (22. ábra).



22. ábra: A vizsgálatban alkalmazott metilációs standard minták (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) olvadáspont elemzésének eredményei második derivált függvénnyel és hőtésképen ábrázolva. A hőtésképek minden sora egy adott hőfokot, és minden oszlopa egy adott mintát jelöl. A metilációs százalékok a színskála szerint: zöld: 0%-ban metilált, piros 100%-ban metilált.

A friss fagyasztott és a biopsziás mintákból izolált DNS mintákkis eltéréssel hasonló DNS metilációs eredményeket mutatott. Érdekes módon a friss fagyasztott minták közül a 6. egészséges minta az összes normális mintától eltérő módon magas DNS metilációs százalékot eredményezett mindkét izolálási módszer esetén, elsősorban az SFRP1 gén esetén, ami valószínűleg mintavételi hibának tudható be (23. ábra/A, B).

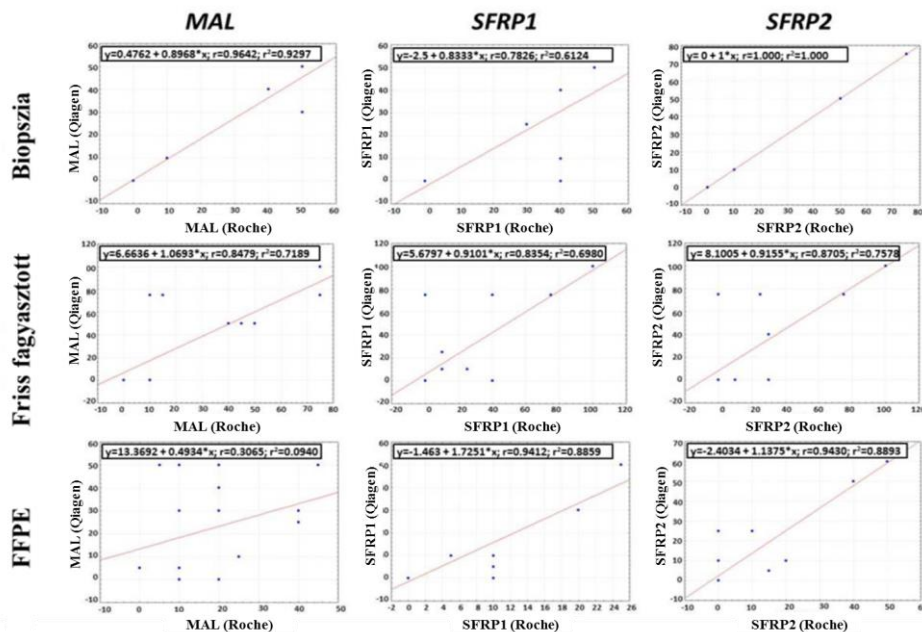
Az FFPE minták között ezzel ellentétben nagyobb fokú különbségek voltak kimutathatóak a különböző izolálási módszerek alkalmazása esetén. Ez a különbség a *MAL* gén esetén volt jelentős, az *SFRP1* és *SFRP2* géneknél kevésbé. A *MAL* assay esetén az egy adott mintacsoporton belüli eredmények szórása is nagyobb volt, ami az automatizált izolálás után még jelentősebbnek bizonyult, mint a kézi módszer után (23. ábra/C). A fentiek alapján a *MAL* primerpárral végezhető vizsgálatok érzékenységét alacsonynak, a háttérzajt magasnak ítéltük.



23. ábra: A vizsgálatban szereplő (a) biopsziák, (b) friss fagyasztott és (c) FFPE biológiai minták becsült DNS metilációs %-a hőtésképen ábrázolva. A hőtésképek minden sora egy adott hőfokot, minden oszlopa egy adott mintát jelöl. A metilációs százalékok a színskála szerint: zöld: 0%-ban metilált, piros 100%-ban metilált. NAT=tumor melletti adjacens normális szövet, FFPE=formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövet.

5.2.1.2.1 A manuális és az automata izolálás alkalmazása után kapott DNS metilációs eredmények összehasonlítása

A különböző izolálási módszerek szintén hasonló eredményeket adtak a biopsziás és a friss fagyasztott minták DNS metilációs értékei tekintetében (biopszia: $R^2_{MAL} = 0,93$; $R^2_{SFRP1} = 0,61$; $R^2_{SFRP2} = 1,00$; friss fagyasztott: $R^2_{MAL} = 0,72$; $R^2_{SFRP1} = 0,69$; $R^2_{SFRP2} = 0,76$). A lineáris regresszió szerint számolt R^2 korrelációs koefficiens értéke alapján megkülönböztettünk mérsékelt ($0,36 < R^2 < 0,67$) és magas korrelációt ($R^2 > 0,67$). Bár a vizsgálat során csak limitált számú minta került elemzésre, a két izolálási módszer DNS metilációs eredményei közt lineáris összefüggést mutattunk ki. Az FFPE mintáknál, ezzel szemben, ez a korreláció alacsonyabb mértékű volt. A három vizsgált gén közül a MAL primer pár eredményei különböztek leginkább ($R^2_{MAL} = 0,09$);, míg az SFRP1 és az SFRP2 gének eredményei között nagyobb mértékű egyezést, erős korrelációt találtunk ($R^2_{SFRP1} = 0,89$; $R^2_{SFRP2} = 0,89$) (24. ábra).



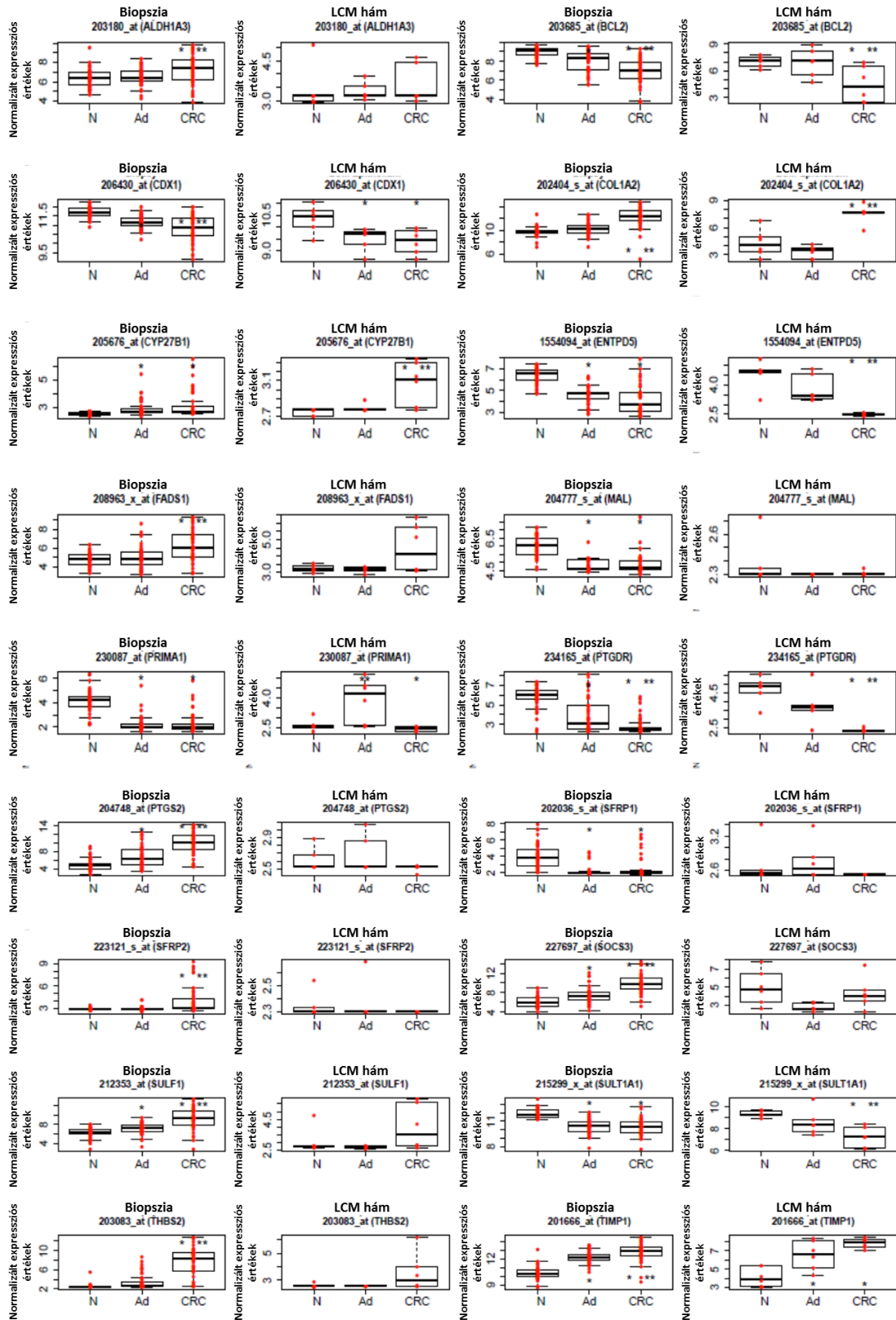
24. ábra: A biopsziás, friss fagyasztott és FFPE minták MAL, SFRP1 és SFRP2 gén DNS metilációs eredményei közötti korreláció a manuális (Qiagen) és automatizált (Roche) izolálási módszerek alkalmazása után. Minden egyes korrelációs diagram az adott mintacsoportban az adott gén becsült metilációs értékeit tartalmazza a két módszert összehasonlítva. A regressziós egyenletek, a korrelációs koefficiens és a determinációs együttható (r^2) a korrelációs diagramok jobb felső sarkában van feltüntetve.

5.2.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákban

5.2.2.1 Génexpressziós vizsgálat

A potenciálisan DNS metilációs szabályozás alatt álló géneket a génexpressziós szintek változása alapján választottuk ki. Korábban publikált génexpressziós vizsgálataink adatai alapján olyan géneket azonosítottunk, amelyek folyamatosan változó expressziót ($p \leq 0,05$) mutatnak a vastagbél adenoma-karcinoma átmenet során. A következő gének szignifikáns génexpressziós eltérése ($p < 0,05$) volt megfigyelhető az adenoma vs. ép és az adenoma vs. tumor összehasonlításokban egyaránt: a *BCL2*, a *CDX1*, a *CYP27B1*, az *ENTPD5*, a *MAL*, a *PRIMA1*, a *PTGDR*, a *PTGS2*, az *SFRP1*, a *SOCS3*, a *SULT1A1*, és a *TIMP1*. Emellett az *ALDH1A3*, a *COL1A2*, a *FADS1*, az *SFRP2*, a *SULF1* és a *THBS2* gének a tumor vs. ép összehasonlításban mutattak szignifikáns génkifejeződésbeli különbséget ($p < 0,01$).

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a többféle sejttípust tartalmazó biopsziás mintákban tapasztalt génexpressziós változások mely sejttípusokból erednek, lézer mikrodisszekciót alkalmaztunk, amely segítségével a hám- és a stroma sejteket egymástól elkülönítve vizsgáltuk. Eredményeink szerint hámsejtekben kimutatható szignifikáns expressziós változást ($p < 0,05$) a *SOCS3* és a *PRIMA1* gének mutattak az adenoma vs. ép összehasonlításban. A *BCL2*, a *CYP27B1*, a *COL1A2*, a *FADS1* és a *SULT1A1* gének kifejeződése csak a tumor-normál összehasonlításokban bizonyult szignifikánsnak ($p < 0,05$), míg a *CDX1*, a *ENTPD5*, a *PTGDR* és a *TIMP1* gének kifejeződése mindkét összehasonlításban változónak adódott (25. ábra).



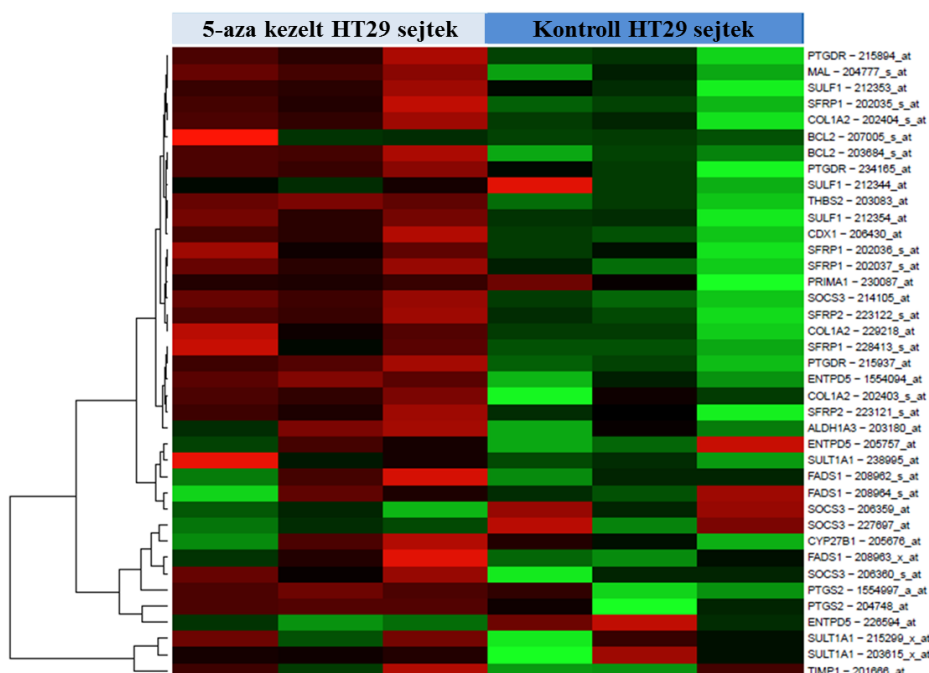
25. ábra: A kiválasztott gének kifejeződése az ép, adenoma és tumoros biopszia mintákon. Az eredményeket boxplotokon ábrázoltuk, párosan jelölve külön a biopsziás

mintákban és a lézer mikrodisszekcióval izolált hámsejtekben tapasztalt változásokat. Az y-tengely a log₂ normalizált génexpressziós értékeket jelöli. A boxplot ábrázoláson az egyedi értékeket piros pontokkal, a medián értéket vízszintes vonallal ábrázoltuk, az adatok szórása dobozokkal került megjelenítésre. Az egyes csoportok közötti összehasonlítások szignifikanciáját ($p < 0,05$) is feltüntettük: az adenoma vs. ép és tumor vs. ép összehasonlításoknál csillaggal jelöltük (*), a tumor vs. adenoma összehasonlítás szignifikanciáját ($p < 0,05$) dupla csillaggal (**) jelöltük. A mért értékeknek megfelelően minden egyes doboz-ábrán más skálát alkalmaztunk. Eredményeink alapján a biopsziás és a lézer mikrodisszekált mintákban tapasztalt génexpressziós mintázatok hasonlóak voltak.

A stromális sejtek esetén egyik gén expressziója sem mutatkozott szignifikánsan eltérőnek az adenoma vs. ép összehasonlításban. Azonban a *COL1A2*, a *FADS1*, a *MAL*, a *PRIMA1*, a *SULF1*, a *THBS2* és a *TIMP1* gének kifejeződése a tumor-normál összehasonlításokban szignifikánsan eltérőnek mutatkozott ($p < 0,05$). Mivel eredményeink alapján a stromális sejtekben kevesebb és kisebb mértékű génexpressziós változást találtunk, későbbiekben elsősorban a lézer mikrodisszekált hámsejteket vizsgáltunk.

5.2.2.2 HT-29 sejtek demetilációs kezelése

A kiválasztott gének kifejeződésbeli mintázatát megvizsgáltuk demetilációs ágenssel kezelt HT-29 humán vastagbél adenokarcinoma sejtvonalon is. A demetilációs kezeléshez 10 μ M 5-aza-2'-deoxicitidint használtunk 72 órás alkalmazási idővel. A kontrollsejtek esetén a demetilációs szer oldószerét, azaz ecetsavat adtunk a médiumhoz. A kezeléstől függetlenül 12 transzkriptum esetén nem volt kimutatható kifejeződés, míg a maradék 6 génből 4 esetén (*TIMP1*, *FADS1*, *CYP27B1*, *SULT1A1*) csekély génexpressziós különbségeket tapasztaltunk. A *PTGS2* gén expressziója fokozódott a demetilációs kezelés hatására (\log_{2} különbség_{kontroll-kezelt} = -1.99), míg a *SOCS3* gén kifejeződése enyhén csökkent (\log_{2} különbség_{kontroll-kezelt} = 0.50) a kontroll sejtekhez képest (26. ábra).

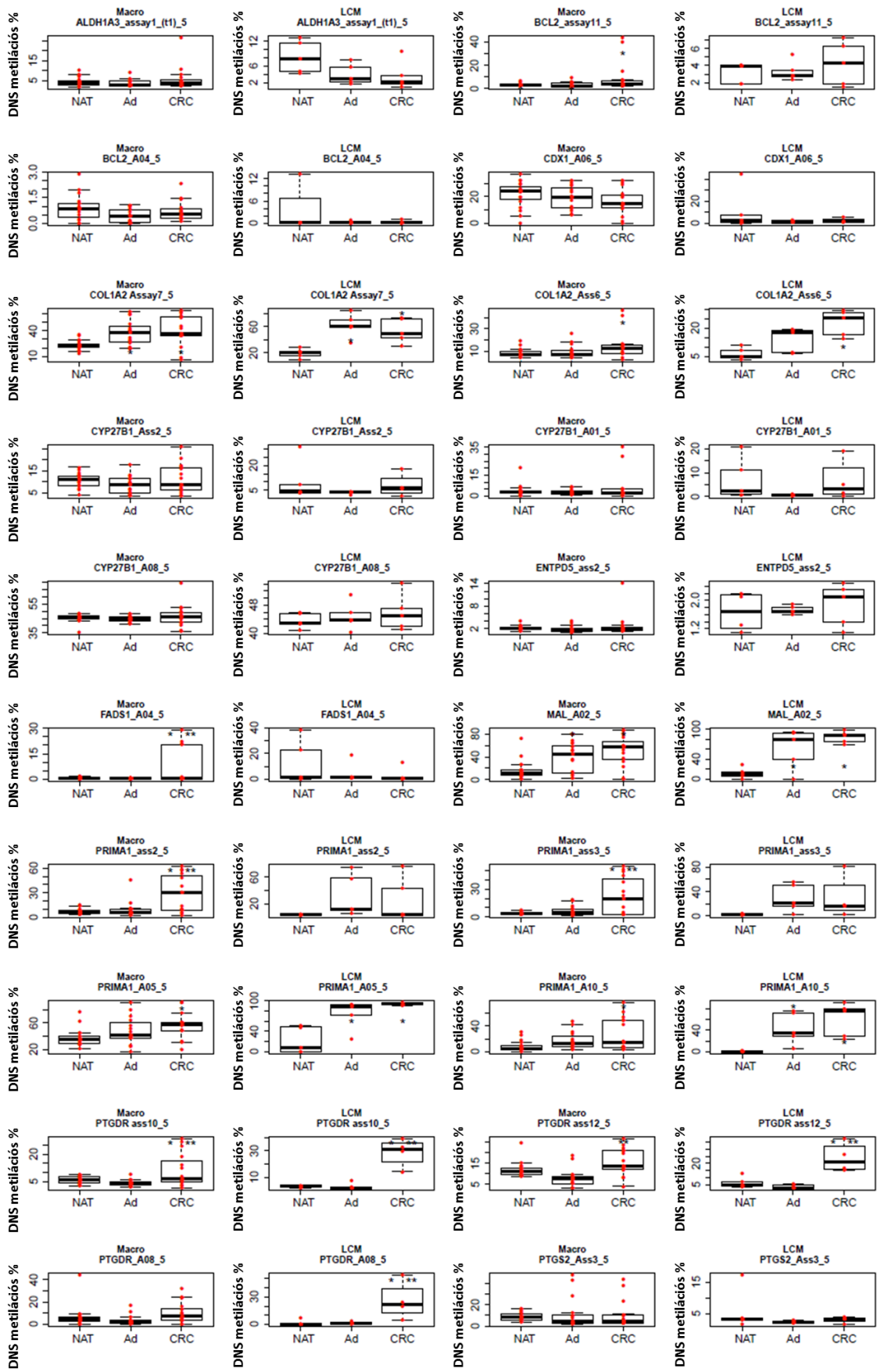


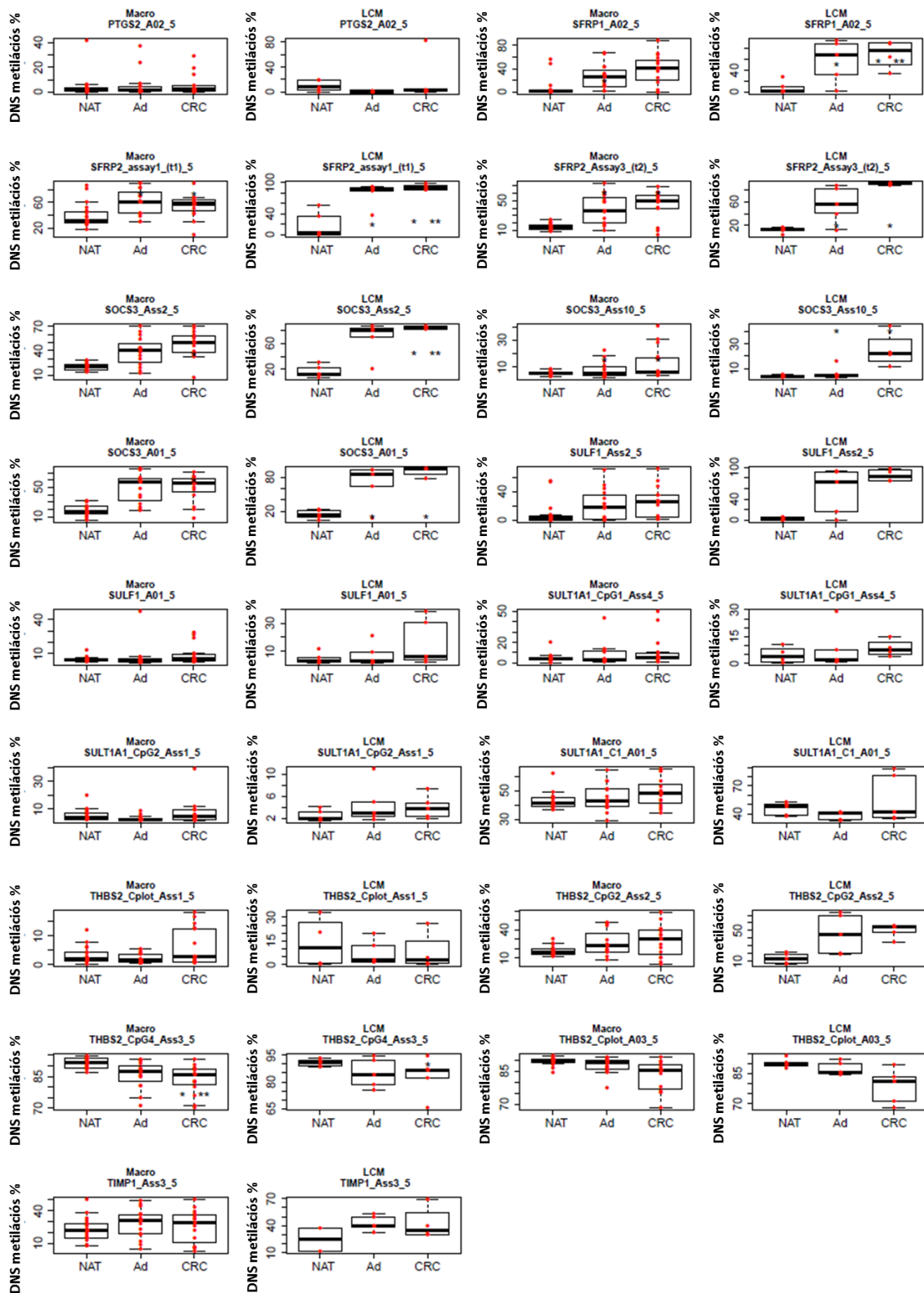
26. ábra: A kiválasztott gének kifejeződésbeli különbségét illusztráló hőmérsékleti térkép a kontroll és az 5-aza-2'-dezoxicitidin demetilációs ágenssel kezelt HT-29 sejtekben. A microarray eredmények intenzitásértékét színskálán ábrázoltuk: piros = magas intenzitás, fekete = közepes intenzitás, zöld = alacsony intenzitás. A kontroll (sötétkék) és kezelt (világoskék) sejt mintákat triplikátumban vizsgáltuk, amelyeket az egyes oszlopok jelölnek, a kiválasztott transzkriptumok pedig egy-egy sorban találhatóak. Az ábrán látható vizsgált gének esetén a demetilációs kezelés bizonyos mértékű génexpresszió növekedéshez vezetett.

5.2.2.3 DNS metilációs vizsgálat

Munkánk során két különböző piroszekvenálási eljárást használtunk. Elsőként a biopsziás és a makrodisszektált, vegyesen hám és kötőszöveti stromális sejteket is tartalmazó szövetmintákat elemeztük. Az eredményeink szerint 18 megváltozott expressziójú transzkriptum közül 4 génhez tartozó 6 vizsgált régió mutatott szignifikáns DNS metilációs szint eltérést. Ezek közül a *COL1A2*, az *SFRP2* és a *SOCS3* gének vizsgált régiója adenoma és tumor mintákban hipermetilálódott, míg a *THBS2* hipometilációt mutatott a NAT mintákhoz képest.

Érdekes módon a *THBS2* vizsgált régiói közül kettő csökkenő, míg egy régiója növekvő DNS metilációs szintet mutatott tumoros mintákban a NAT mintákhoz viszonyítva (27. ábra).

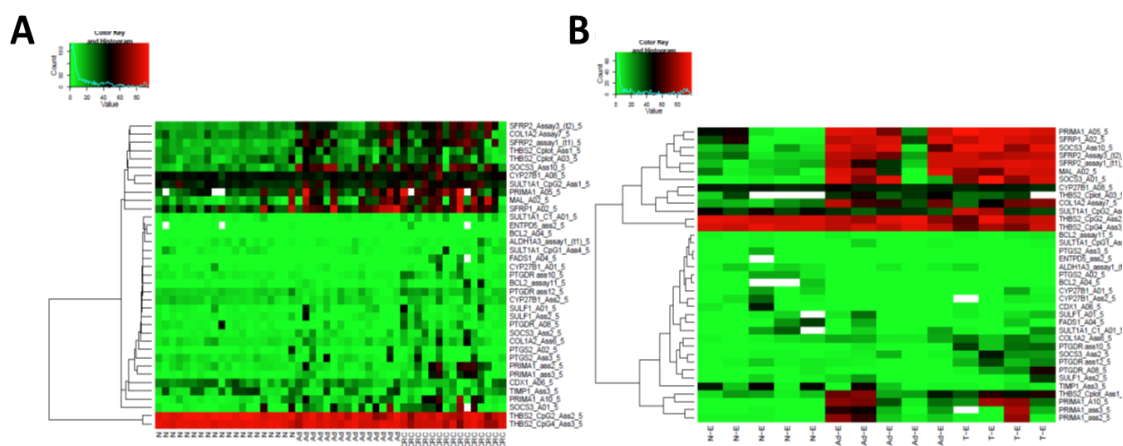




27. ábra: A DNS metilációs eredményeket illusztráló box plot ábrák a biopsziák és makrodisszektált NAT, adenoma és CRC minták esetén. A piros pontok DNS metilációs értékeket jelölnek, a dobozokban lévő vonal a mediánt, a doboz a szórást mutatja. Az y-

tengely a minták DNS metilációs % értékeket jelöli. Az egyes csoportok közötti összehasonlítások szignifikanciáját ($p < 0,05$) is feltüntettük: az adenoma vs. ép és tumor vs. ép összehasonlításoknál csillaggal jelöltük (*), a tumor vs. adenoma összehasonlítás szignifikanciáját ($p < 0,05$) dupla csillaggal (**) jelöltük. A mért értékeknek megfelelően minden egyes doboz-ábrán más skálát alkalmaztunk. Eredményeink alapján néhány gén DNS hipermetilációja mind biopsziás, mind lézer mikrodisszekált hámsejtekben jelentkezett (például a *MAL*, a *PRIMA1*, a *PTGDR* és az *SFRP2*), míg voltak olyan gének is, amelyekben nem volt kimutatható jelentős DNS metilációs szintváltozás a csoportok között (például a *BCL2*, a *CDX1*, a *PTGS2* és a *SULF1*). Makro = Makrodisszekált minták, LCM = lézer mikrodisszekált sejtek.

A gének DNS metilációs adatait előzetes csoportmegadás nélküli (unsupervised) hierarchikus klaszter elemzéssel vizsgáltuk, amely alapján 3 nagy csoportba lehetett osztani őket. Az első nagyobb csoport (*SFRP2*, *COL1A2*, *THBS2*, *SOCS3*, *CYP27B1*, *SULT1A1*, *PRIMA1*, *MAL*) viszonylag magas szintű DNS metilációt mutatott adenoma és tumoros mintákban is. A második csoportba sorolódó gének nem mutattak jelentős DNS metilációs szintbeli eltérést a betegcsoportok között. A harmadik klaszterbe csak a *THBS2* gén sorolódott, amely relatív magas DNS metilációs szinttel rendelkezett a mintákban (28. ábra/A).

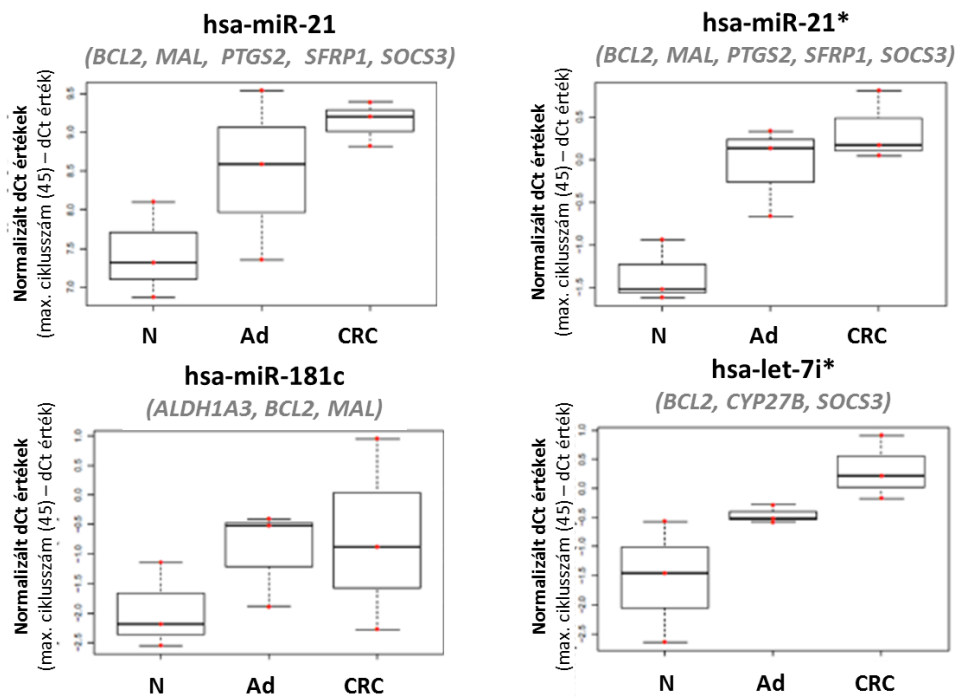


28. ábra: A kiválasztott gének DNS metilációs szint különbségét illusztráló hőmérsékleti térképek. A) NAT, AD és CRC biopsziákban és mikrodisszektált mintákban és B) NAT, AD és CRC lézer mikrodisszektált hámsejtekben. A DNS metilációs eredményeket színskálán ábrázoltuk: piros = magas, fekete = közepes, zöld = alacsony DNS metilációs szint. A mintákat oszlopokban, a géneket sorokban ábrázoltuk. Hasonló DNS metilációs mintázatokat találtunk a különböző mintatípusokban, hiszen a *PRIMA1*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *MAL*, a *SOCS3*, a *CYP27B1*, a *COLIA2* és a *SULT1A1* gének vastagbél biopsziákban és LCM hámsejtekben egyaránt viszonylag magas DNS metilációs szintet mutatott. N-E = egészséges hámsejtek, Ad-E = adenoma hámsejtek, T-E = CRC hámsejtek.

A lézer mikrodisszektált hámsejtek DNS metilációs eredményei alapján a biopsziás és a makrodisszektált mintákhoz hasonló csoportosítást kaptunk. A *PRIMA1*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *MAL*, a *SOCS3*, a *CYP27B1*, a *COLIA2* és a *SULT1A1* gének viszonylag magas DNS metilációs szintjét tapasztaltuk mind vastagbél biopsziákban, mind az adenoma és tumoros szövetminták hámsejtjeiben. A második csoportba tartozó gének között azok szerepeltek, amelyek nem mutattak jelentős DNS hiper-vagy hipometilációt (28. ábra/B).

5.2.2.4 miRNS vizsgálat

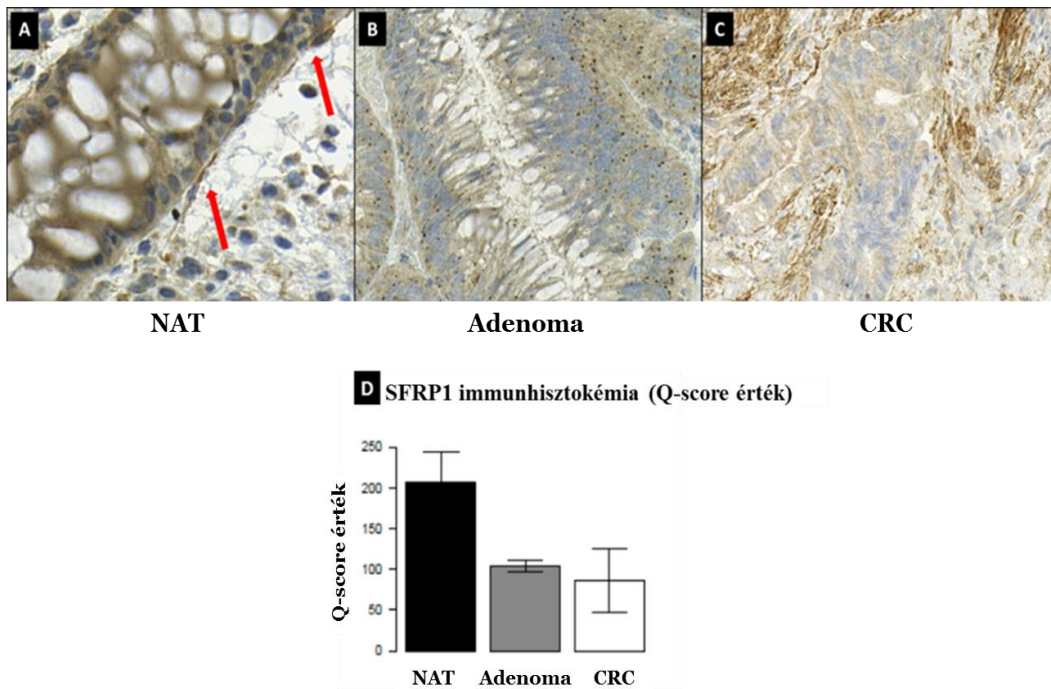
A változó kifejeződést mutató miRNS-ek célpontjainak kiválasztásához miRWALK adatbázist használtuk. *In silico* miRWALK validált modul segítségével számos miRNS célpontot azonosítottunk. A vizsgált miRNS-ek között volt olyan, amely az általunk vizsgált gének transzkriptumait célozta. Ilyen volt például a *BCL2*, a *MAL*, a *PTGS2*, az *SFRP1* és a *SOCS3* gének transzkriptumait potenciálisan célzó miR-21, amelynek kifejeződése a vastagbél-daganat kialakulása során szignifikánsan növekedett. A miR-21* (célpontjai: *BCL2*, *MAL*, *PTGS2*, *SFRP1*, *SOCS3*), a *let-7i** (célpontjai: *BCL2*, *CYP27B*, *SOCS3*) és a *miR-181c* (célpontjai: *ALDH1A3*, *BCL2*, *MAL*) szintén fokozott expressziót mutatott (29. ábra).



29. ábra: A kiválasztott miRNS-ek (hsa-miR-21, hsa-miR-21*, hsa-miR-181c, hsa-let-7i*) normalizált valós idejű polimeráz láncreakciója során kapott Cp értékei. A nyers Cp értékeket a technikai interplate kalibrátorokkal és a legkisebb szórást mutató miR-423-5p értékeivel normalizáltuk. A piros pontok a normalizált Cp értékek, a box plot vonala a mediánt, a doboz a szórás értékeket mutatja. A Cp értékek fordítottan arányosak a miRNS-ek kifejeződésének mértékével. (N = NAT, Ad = adenoma, CRC = vastagbél-daganat minták)

5.2.2.5 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai vizsgálat során vastagbél szövetekben vizsgáltuk az SFRP1 gén fehérjetermékének kifejeződését. A NAT mintákban mérsékelt diffúz festődés (+2) volt látható, ezzel szemben a miofibroblaszt sejtekre az erős diffúz festődés (+3) volt jellemző (30. ábra/A). A tubuláris adenoma mintákban gyenge citoplazmatikus fehérjekifejeződést (+1) tapasztaltunk, amelyet néhány területen erős, pontszerű immunfestődés (+2/+3) kísért (30. ábra/B). A tumoros minták többségében (9/10) csupán gyenge (+1) vagy 0 intenzitású immunfestődést lehetett kimutatni (30. ábra/C). A Q-score elemzés alapján az SFRP1 összfehérje mennyisége a vastagbél ép-adenoma-karcinoma átmenet során csökken (30. ábra/D).

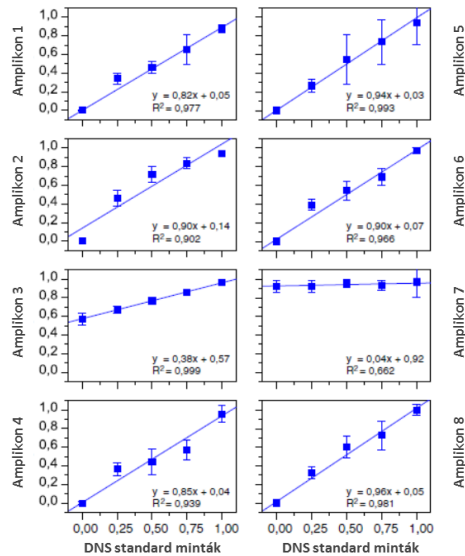


30. ábra: SFRP1 immunohisztokémiai vizsgálatok eredményei reprezentatív A) NAT, (B) adenoma és (C) CRC mintákon. A hámszövetekben az SFRP1 fehérje kifejeződése az erősen festődő (+3) miofibroblaszt sejtekhez, mint belső kontrollokhoz hasonlítható (A, piros nyilak). (D) A szemikvantitatív immunhisztokémiai vizsgálat eredménye (Q-score értékek) a NAT, AD és CRC minták esetén, amely oszlopdigramok segítségével illusztrálja a mért értékeket, míg a hibajelek a szórást jelzik. Az SFRP1 gén által kódolt fehérje vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása mentén folyamatosan csökkenő fehérje kifejeződését mutattunk ki.

5.3 A SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata lézer mikrodisszekált hám és stromális sejtekben

5.3.1 DNS metilációs standard minták vizsgálata

A vizsgálathoz használt 13 primerpár segítségével végzett multiplex PCR reakciók során felszaporított amplikonok közül 8 olyan volt, amely a *SEPT9* gén régióinak vizsgálatát tette lehetővé. A 3. amplikon kivételével, amely CpG-ritka területeknek mondható, a vizsgált régiók CpG-denz régiókra térképezhetőek vissza. Ezek az amplikonok összesen 130 CpG dinukleotidot fedtek le. Elsősorban CpG-denz régiókra térképezhetőek vissza az amplikon 3 kivételével, amely CpG ritka területnek mondható. A kalibrációs minták használatával lehetőségünk volt ellenőrizni, hogy a tervezett primer párok használatával mennyire helyesen becsülhetőek meg a biológiai minták DNS metilációs százaléka. Az ismert metilációs százaléku minták várt és kapott metilációs százalék értékeit egy koordináta rendszerben ábrázoltuk, majd a lineáris regressziót alkalmaztuk. Az adott primerpár becsülésének helyességét a kapott egyenes meredeksége és az egyenes egyenlete alapján ítéltük meg. A fentiek alapján elmondható, hogy a vizsgált nyolc amplikon közül hat esetében kaptunk megbízható eredményeket (31. ábra). Érdekes, hogy a nem metilált kontrollként használt spermium DNS vizsgálatainkban nem bizonyult megfelelő kontrollnak, mivel a fennmaradó két amplikon esetén nem 0%-os, hanem részleges metilációt mutatott. Ennek ellenére, - mivel a biológiai minták esetén konzisztens eredményeket kaptunk az utóbbi két assay-vel is-, ezeket sem zártuk ki az elemzésből. Így együttesen 96 különböző minta 8 amplikonjára vonatkozó metilációs adatokat elemeztük.



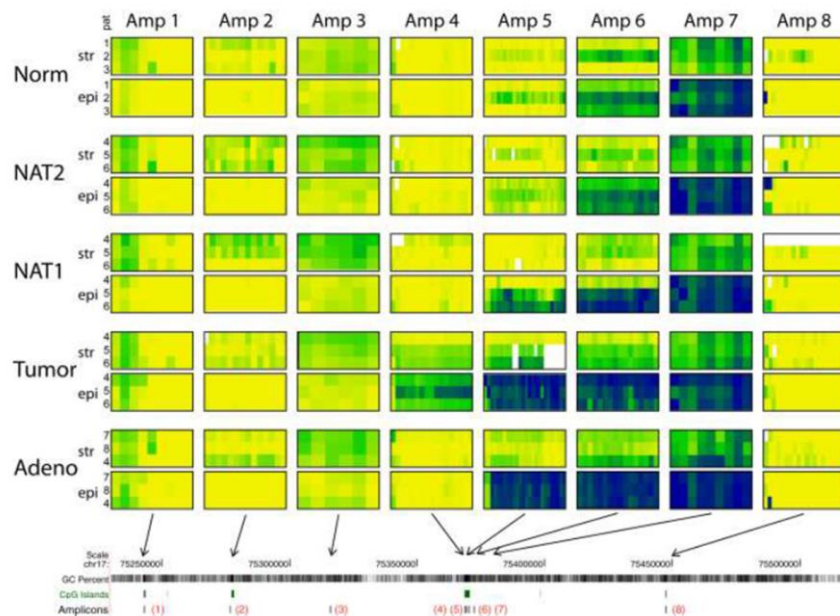
31. ábra: Az amplikonok kalibrációs egyenesei. Az ábra a mesterségesen metilált és nem metilált DNS standardok különböző arányaival kapott eredményeket jeleníti meg. Az x-tengelyen a várt, míg az y-tengelyen a kísérletesen meghatározott DNS metilációs arány látható. Mindkét tengely értékei százalékban vannak kifejezve.

5.3.2 A *SEPT9* gén DNS metilációs szintje

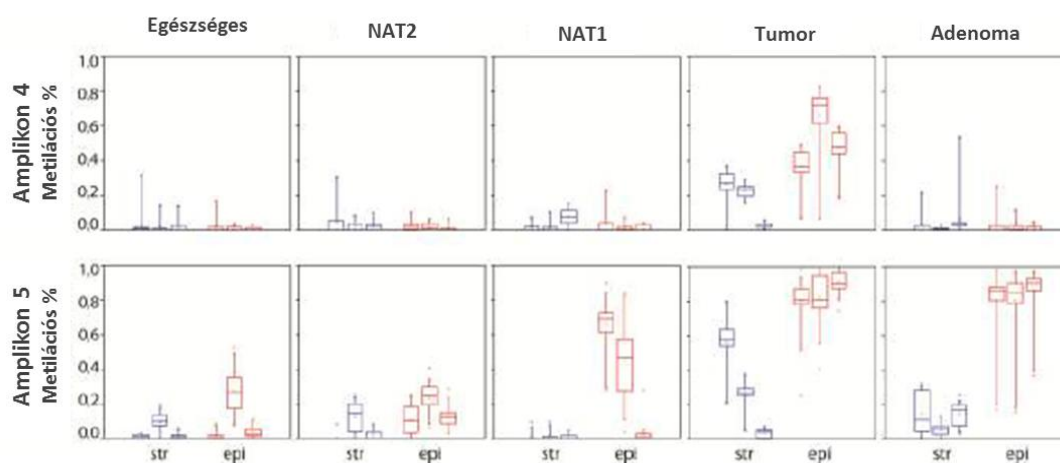
A *SEPT9* génben vagy közelében elhelyezkedő amplikonok eredményei alapján egy ún. DNS metilációs látképet tudunk felállítani. Összesen négy, egy extragenikus és három intragenikus CpG szigetet vizsgáltunk, amelyeket CGI1, CGI2, CGI3 és CGI4 jelölésekkel láttuk el. Ezek közül a harmadik CpG sziget a leghosszabb, vizsgálatunk során ezt három nem átfedő amplikkonnal fedtük le, amely már korábbi irodalmi adatok alapján vastagbél daganatos mintákban hipermetiláltak bizonyult a normális kontroll mintákhoz képest.

Eredményeink alapján vastagbél daganatra jellemző DNS metilációs szintkülönbség kizárólag a CGI3-ban volt látható, míg a többi régió nem mutatott lényeges eltérést. A CGI3-ban centrálisan elhelyezkedő 5. amplikon jelentős DNS metilációs különbségeket mutatott a normális és az adenoma, valamint a tumoros szövetek között. Ez a különbség főként az epitheliális sejtekre volt jellemző, míg a stromális sejtekről ez nem mondható el. A normális és a tumoros hámsejtek DNS metilációs szintkülönbsége elérte a 80%-ot is ($p < 0,0001$), és ugyanilyen mértékű különbséget tudunk kimutatni a normális vs. adenoma viszonylatban is. A NAT1 minták, tehát azok a makroszkópicusan és

mikroszkópiusan is ép szövetek, amelyek a tumortól kevesebb, mint egy centiméterre helyezkedtek el, jelentős DNS metilációs szintkülönbséget mutattak a három vizsgált daganat közül kettő esetén a kontroll mintákhoz képest ($p < 0,0001$), amely eredmény az ún. mező hatás (field-effect) koncepciót támogatja. A távolabbi ép területekről (NAT2) vett szövetmintákban ez a különbség nem volt kimutatható ($p > 0,05$). Ezzel ellentétben a tumor szövetekből izolált stromális sejtekben normálshoz képest mintegy 50%-os hipermetiláció volt kimutatható, míg ez adenomákban csupán 30%-os volt. A hámsejtekkel ellentétben a stromális sejtek nem mutattak DNS metilációs szintkülönbséget a NAT területeken (32, 33. ábra).



32. ábra: A biszulfit DNS szekvenálás eredményei az öt különböző mintatípusban és kétféle sejttípusban hőmérsékleti térképen ábrázolva. Minden oszlop egy-egy amplikont ábrázol, vízszintesen a tömbök mintatípusokat (ép, NAT1, NAT2, tumor, adenoma), ezen belül számokkal jelölve a három páciens műtéti mintáját jelöli, a stroma (str; felső sor) és a hámsejtekben (epi; alsó sor). A három páciens három sor jelöli. Az ábrán minden négyzet egy-egy CpG dinukleotid metilációs százalék értékét jelöli. Az ábra alsó részén látható az egyes amplikonok elhelyezkedése a genomban. A színskála: sárga = nem metilált (0%), zöld = részben metilált (~50%), kék = teljesen metilált (100%), fehér = nincs adat. Rövidítések: str = stromális sejtek, epi = hámsejtek, norm = egészséges vastagbéliszövet, NAT1/2 = adjacens normális szövet közel és távol a tumoros területtől, adeno = adenoma szövet, pat = páciens sorszáma.



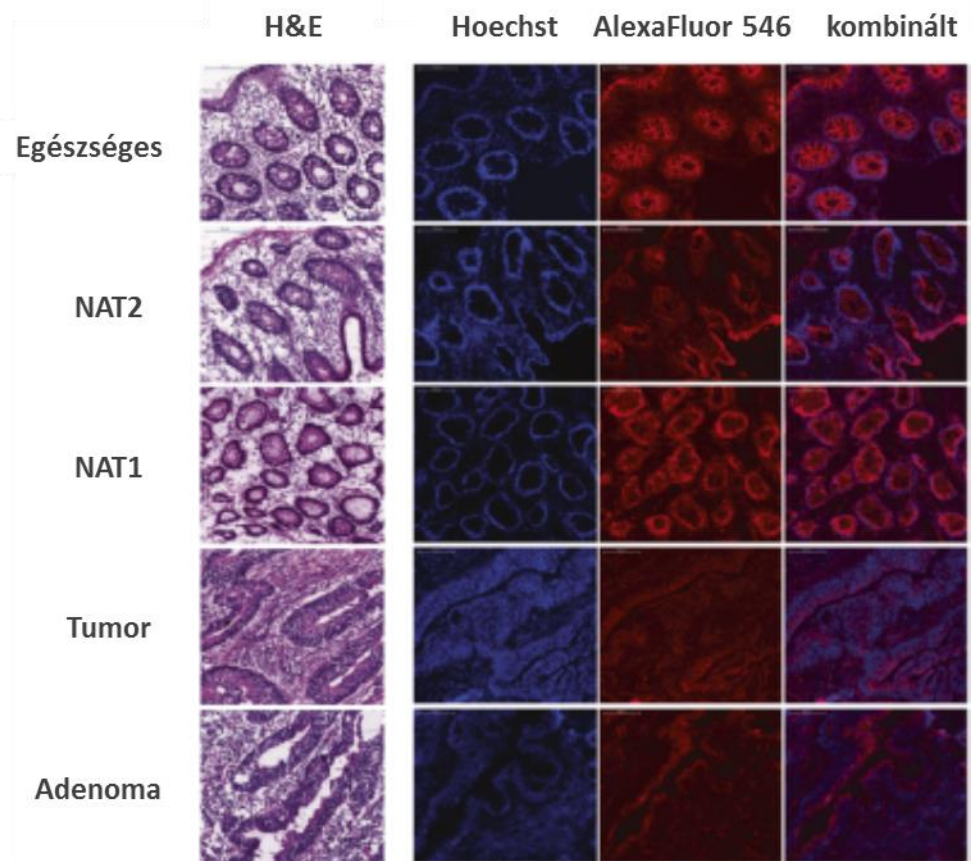
33. ábra: A 4. és 5. amplikon DNS metilációs adatait ábrázoló box plot. Az ábrán külön feltüntettük a stromális és a hámsejtek eredményeit is mindhárom vizsgált páciens esetében. A dobozok közepén lévő vonal a mediánt, a pont az átlagot, a doboz az adatok 50%-át, a hibajelek pedig a szórást jelzik.

Eredményeink azt mutatják, hogy a normális mintákhoz viszonyított tumorokban tapasztalható DNS hipermetiláció a CGI3 CpG szigetről az 5' vég felé terjed, amelyet a 4. amplikon fedett le. Ez a metilációs terjedés kizárólag a tumor mintákban volt megfigyelhető, mind az epiteliális, mind a stromális sejtekben megfigyelhető volt. A tumorokkal ellentétben az adenomákra ez nem volt jellemző. A CGI3 3' vég felé eső 7. amplikon a normális hámsejtekben mutatott fokozott metilációs szintet a stromális sejtekhez képest. Ebben az amplikonban minden CG dinukleotidban szereplő citozin metilált volt, míg a stromában csak részleges metilációt figyeltünk meg. A negyedik és ötödik amplikonnal ellentétben a tumorhoz kapcsolható DNS metilációs szintemelkedés a 7. amplikonban nem volt megfigyelhető. A fenti megfigyelés a CGI3 ún. metilációs boundary-elem jelenlétére enged következtetni.

A fenti jelentős változások mellett egyedi metilációs különbségek is felfedezhetőek voltak, például CGI2 területén. Bár a vizsgálat során csak korlátozott beteganyag állt rendelkezésünkre, ezek átlagolása megbízható adatokat eredményezett. A második amplikon a CGI2-n belül helyezkedik el, a *SEPT9_v1* TSS régiójának közelében, amely valószínűleg a gén legmeghatározóbb transzkriptuma.

5.3.3 Septin 9 immunhisztokémia

Az alkalmazott immunfestés minden szövetmintában jelet eredményezett, de ez a festődés, így a Septin 9 fehérje szintje a különböző csoportokban eltérőnek mutatkozott. Szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabb Septin 9 fehérje szintet tudtunk kimutatni az egészséges minták és a NAT1 hám és stroma sejtjeiben, mint az adenoma vagy a tumoros mintákban, ahol csökkent Septin 9 fehérje kifejeződés volt jellemző (34. ábra).



34. ábra: A vizsgált metszetek szövettani és immunhisztokémiai elemzése reprezentatív képekkel illusztrálva. Az első oszlopban a hematoxilin-eozin festett metszetek képei látszanak, a második oszlopban a Hoechst magfestés, a harmadik oszlopban az AlexaFluor 546 másodlagos ellenanyaggal jelzett Septin 9 fehérje, az utolsó oszlopban pedig az előző kettő kategória közös ábrázolása látható. Az ábrák 20x-os nagyításúak, az ábrákon található jelzés 100 μm -nek felel meg.

6 MEGBESZÉLÉS

A hagyományos tumor osztályozás alapja a hisztopatológia, amely a szövettani metszetek patológus szakember általi kiértékelését foglalja magába. A jövőben a patológusok feladatát megkönnyíthetik olyan molekuláris biológiai vizsgálatok, amelyek objektív klasszifikációt tesznek lehetővé.

PhD munkám során egészséges, adenoma és daganatos vastagbéliszövet mintákat vizsgáltam. Első lépésben megvizsgáltam, hogy a jövőben a hagyományos kézi RNS izolálás módszerét milyen megbízhatósággal lehet automatizált módszerekkel helyettesíteni, majd az így kivont RNS minta génexpressziós vizsgálatokban való alkalmazhatóságát teszteltem. Az mRNS kifejeződés vizsgálatára a friss fagyasztott szövetek a legjobb minőségű minták, ezekkel hasonlítottam össze formalin-fixált, paraffinba-ágyazott minták alkalmazhatóságát. Egy korábban azonosított vastagbélrákra jellemző transzkriptum panel kifejeződését sikeresen elemeztem mindkét szövetmintatípuson. Ezek után az automatizált DNS kivonás lehetőségeit teszteltem, szintén friss fagyasztott és FFPE anyagok felhasználásával. A vastagbél-daganat kialakulása során számos gén kifejeződése megváltozik, amelynek hátterében különböző epigenetikai, például DNS metilációs változások állhatnak. Bár napjainkra már számos DNS metilációs marker ismert, vizsgálataim során a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során fokozatosan csökkenő expressziójú gének DNS metilációs szintjét határoztam meg biosziás, valamint lézer mikrodisszekált vastagbél hám és stromasejteken. Ezzel a megközelítéssel megállapítottam, hogy a vastagbél-daganatokra jellemző DNS hipermetiláció főként a hámsejtek változásaiból ered és az általam vizsgált gének közül főként a *PRIMA1*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *MAL*, a *SOCS3*, a *CYP27B1*, a *COLIA2* és a *SULT1A1* génekben volt jellemző. Végezetül egy olyan ismert vérplazma alapú diagnosztikus DNS metilációs marker, a SEPT9 szöveti DNS metilációs szintjét vizsgáltam vastagbél hám és stromasejteiben, amelyet a vastagbél-daganat kialakulása során fokozódó hipermetiláció jellemez és a plazmában keringő nukleinsavból kimutatható.

6.1 A vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata automatizáltan izolált friss fagyasztott biopszia és FFPE mintákon

6.1.1 Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

A rutin patológiai vizsgálatok során elemzett szövetminták automatikus kezelése kulcsfontosságú lehet különböző molekuláris biológiai vizsgálat bevezetése szempontjából. Az automatizált nukleinsav izoláló automatáknak a megfelelő RNS/DNS kihozatal mellett biztosítani kell a megfelelő tisztaságot és a lehető legnagyobb nukleinsav integritást.

A MagNA Pure 96 automatizált és a Qiagen kézi izolálási módszer eredményei szerint bár a manuális RNS izolálással több tekintetben jobb minőségű minta kapható, az automatizált módszer is megfelelő RNS mennyiségeket eredményezett friss fagyasztott és FFPE minták esetén egyaránt. A kivont nukleinsavak tisztasági értékei fontosak az alkalmazott molekuláris biológiai elemző módszer szempontjából, így az automatizált módszerrel FFPE mintákból izolált RNS esetén tapasztalt alacsony OD260/280 és OD260/230 értékek a minták alkalmazhatósága szempontjából limitációt jelenthetnek. Összességében nagy áteresztőképességű laborok rutin feladatai számára a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszer megfelelő megközelítés lehet a friss fagyasztott szövetekből és FFPE mintákból történő RNS izolálásra.

A manuális és automatizált nukleinsav izoláló módszerek összehasonlítását a 15. táblázat foglalja össze.

15. táblázat. A manuális és automatizált nukleinsav izoláló módszerek összehasonlítása

	Manuális RNS/DNS izolálás	Automatizált izolálás
Egyszerre feldolgozható minták száma	24 (asztali centrifuga kapacitás és gyakorlottságtól függően)	48/96 protokolltól függően
Izolálás teljes ideje	kb. 1 óra	kb. 1,5 óra
Előkészítési/gyakorlati idő	kb. 1 óra	kb. 10 perc
Keresztszennyeződés lehetősége	lehetséges	minimális (UV lámpa)
Reprodukálhatóság	személy-függő	standardizált folyamat
Költségek relatív (reagensek, műanyagáru)	alacsony	magas

6.1.2 Vastagbélrákra jellemző RNS markerek vizsgálata FFPE mintákon

A különböző szövetekből kiinduló automatizáltan izolált RNS analitikai paramétereik gyakran eltérnek, amelyek kritikusak lehetnek a további vizsgálatok szempontjából. Jelen vizsgálatban a friss fagyasztott biopsziákból és az FFPE mintákból izolált nukleinsavak mennyisége nagyságrendileg azonos volt, amely az irodalmi adatokkal megegyeznek [114]. Vizsgálatunkban összesen 150 ng mennyiségű RNS elegendő volt 11 kiválasztott marker génexpressziós vizsgálatához, amelyet egyszerű munkamenetben, előre legyártott, a primereket liofilizált formában tartalmazó plate-k segítségével hajtottunk végre. A korábbi metodikai közlemények megfigyeléseihez hasonlóan [115, 116], az RNS tisztaságát jelző OD260/280, OD260/230 értékek, valamint a RIN értékek is alacsonyabbak voltak az FFPE minták esetén, mint a friss fagyasztott mintákból izolált RNS-eknél. Ennek ellenére, az FFPE minták többségével sikeres génexpressziós vizsgálatot végeztünk, a 11 vizsgált esszé közül csupán 3 mutatott nem megbízható eredményeket. Az FFPE minták alkalmazása során az optimalizálás egyik kulcspontja a polimeráz láncreakcióban alkalmazott ampikonok hosszának minimalizálása [117], így feltételezhető, hogy néhány gén tekintetében még rövidebb ampikonhosszak alkalmazásával a mi vizsgálatunk is eredményesebb lett volna.

Közismert tény, hogy a vastagbél daganatok fejlődése során különböző génekben expressziós különbségek mutathatók ki [7]. Számos tanulmány által célzott teljes genom expressziós vizsgálatok eredményei alapján olyan klinikailag hasznosnak bizonyuló markerek azonosítására van lehetőség, amelyek később a rutin diagnosztika részeként a daganatok hatékonyabb osztályozását segíthetik [118-120]. Néhány vizsgálat ezek közül az egészséges és a daganatos vastagbél hámszövetek génexpressziós különbségei alapján kiválasztott marker csoportokra koncentrált [121-123].

Elsők közt Alon és munkatársai egy 2000 transzkriptumból álló szettet írtak le, amely 22 normális és 30 CRC mintát tudott klasszifikálni [124]. Ezt a közleményt számos, kevesebb tagból álló marker csoport közzlése követte [125, 126]. Notterman és munkatársai által 2001. évben szintén egy Affymetrix oligonukleotid array segítségével, már adenoma mintákat is felhasználva azonosított egy 4000 tagú elkülönítő génszettet [127].

Jelen vizsgálat célja az volt, hogy a 11 tagból álló CRC-specifikus marker szett alkalmazhatóságát tesztelje független biopsziás és FFPE mintahalmazon. Eredményeink alapján, annak ellenére, hogy a vizsgálat csak limitált mintaszámot tartalmazott, az FFPE minták előzetes csoportmegadás nélküli hierarchikus elkülönítése is nagy hatékonyságú volt.

A feladat nehézségét tükrözi az az összehasonlító közlemény is, amely a génexpressziós profilozáson alapuló tanulmányok eredményeit rendszerezésével 23 független génexpressziós elemzésből összesen 54 olyan gént azonosított, amelyet legalább kettő közlemény megemlített [128]. Továbbá a CRC kialakulásának komplex molekuláris háttere ellenére a vizsgálatok jelentős hányada csupán egyedi markerek azonosítására és tesztelésére törekszik (például daganatban fokozódó kifejeződésű *IL8*, *AXIN2*, *CXCL12*, *CDK8*; és alulregulálódó *CA2*, *COLIA2*, *FABP1*, *IGFBP7*) [129].

Ezt követően számos vizsgálat tűzte ki célul, hogy microarray technikával a vastagbél adenoma vs. egészséges [130, 131], valamint tumor vs. egészséges szövetminták közti elkülönítő transzkriptumokat azonosítson, majd a tapasztalt változásokat RT-PCR technikával validálja [132]. A fentiek között olyan tanulmányok is voltak, amelyek nagyszámú elkülönítő transzkriptum csoportokat azonosítottak (például. Williams és mtsai; 2632 elkülönítő gén a CRC vs. egészséges vastagbél szövet összehasonlításban), míg más kutatócsoportok szűkebb szettekét közölték (például [133, 134]) (16. táblázat).

16. táblázat: Vastagbél daganat mintákat vizsgáló génexpressziós tanulmányok összefoglalása.

Munkacsoport	Év	Vizsgált mintatípus			Azonosított elkülönítő gének száma	Referencia
		Egészséges	Adenoma	CRC		
Alon és mtsai.	1999	22	-	40	2000	[124]
Notterman és mtsai.	2001	22	4	10	4000	[127]
Kitahara és mtsai.	2001	8	-	8	235	[123]
Yanagawa és mtsai.	2001	-	-	10	47	[134]
Lin és mtsai.	2002	20	9	11	51/427	[125]
Zou és mtsai.	2002	8	-	9	250	[126]

Munkacsoport	Év	Vizsgált mintatípus			Azonosított elkülönítő gének száma	Referencia
		Egészséges	Adenoma	CRC		
Williams és mtsai.	2003	20	-	20	2632	[132]
Kwon és mtsai.	2004	12	-	12	112	[135]
Koehler és mtsai.	2004	25	-	25	40	[136]
Bianchini és mtsai.	2007	13	-	25	584	[137]
Grade és mtsai.	2007	30	-	73	17	[133]
Groene és mtsai.	2006	-	-	36	45	[138]
Li és mtsai.	2004	-	-	10	429	[139]
Kita és mtsai.	2006	12	12	-	180/-	[130]
Kleivi és mtsai.	2007	-	-	18	89	[140]
Ki és mtsai.	2007	-	-	27	46	[141]
Lin és mtsai.	2007	-	-	48	778	[125]
Birkenkamp-Demtroder és mtsai.	2005	20	-	25	186	[142]
Kim és mtsai.	2008	5	5	-	124	[143]
Croner és mtsai.	2008	-	-	80	50	[121]
Galamb és mtsai.	2008	11	20	22	3/5	[144]
Garcia Bilbao és mtsai.	2012	33	-	31	7	[145]
Galamb és mtsai.	2012	49	49	49	11	[146]

A vastagbél-daganat kialakulásának kutatását célzó különböző génexpressziós vizsgálatok eredményei meglehetősen eltérnek. Ez a különbség egyrészt az alkalmazott vizsgálati módszerek különbségeiből, a vizsgált minták kritériumrendszeréből, célkitűzésbeli különbségekből és a kiértékelési módszerek és alkalmazott határértékek (threshold) eltéréseiből fakadhat.

Magas szenzitivitás és specificitás értékek elérése érdekében azonban bizonyítottan több markeres szettekre van szükség, amelyek az egyedi markerek alkalmazásánál mindig jobban működnek [147]. Jelen vizsgálat során kutatócsoportunk által leírt marker szett

[146] szenzitivitása friss fagyasztott mintákon 93,3%-os, FFPE mintákon 96,7%-os, míg specificitása 86,7%-os, illetve 70%-os volt.

Garcia-Bilbao és munkatársai viszonylag magas elkülönítőképességet (90,9%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást) tudtak elérni nem tumoros és CRC-s minták összehasonlításában egy 7 markeres szett (*ENCI*, *ACAT1*, *TMM132A*, *CMTM7*, *FAM60A*, *MADCAM1*, *DDX55*) RT-qPCR-es vizsgálatával alkalmazásával [145]. Egy másik vizsgálat során, amelyben FFPE mintákat vizsgáltak nem csupán mRNS markerek (neuroendokrin differenciáció, overexpression sialyl-Lex antigén fokozott kifejeződése, perifériás benzodiazepin receptor (PBR) fokozott kifejeződése, BAX fehérje kifejeződés és p53 mutációs státusz) alkalmazásával 83,3%-os specificitással és 70,8%-os szenzitivitással sikerült elkülöníteni a normális és a tumoros szövetmintákat [147].

Az *in situ* mRNS expressziós vizsgálatokat két különböző transzkriptum esetén végeztünk el, mindkettő esetében azonos irányú kifejeződésbeli változást találtunk, mint a valós-idejű polimeráz láncreakció esetén. Tudomásunk szerint kutatócsoportunk végezte először a karbon-anhidráz VII *in situ* mRNS kimutatását vastagbéliszöveten. A daganatokban jellemzően csökkenő kifejeződésű *CA7* gyenge *in situ* hibridizációs (ISH) jelet adott az egészséges vastagbéliszöveti mintákban, adenomákban és CRC-ben pedig nem volt kimutatható. Ezzel ellentétben a kemokin (C-X-C motívum) ligandum 1 daganatokban fokozottan expresszáldott az RT-PCR eredményeink alapján, amit az *in situ* hibridizációval is sikerült megerősítenünk. A CRC mintákban határozott jeleket láttunk, de adenomában és normális mintákban *CXCL1* ISH jel nem volt kimutatható. Az *in situ* hibridizációs kísérletek során információt nyerhettünk a két vizsgált transzkriptum adenomákban és tumorokban való lokális kifejeződéséről. A *CA7* expresszió jellemzően a normális vastagbéliszövet hámsejteiben, míg a *CXCL1* kifejeződés főként a tumoros szövetek kifelélyesedett területeinek stromális sejteiben volt jellemző.

Az FFPE mintákon alkalmazott néhány RT-PCR assay (*MMP3*, *CA7*, *IL8*) esetén tapasztalt sikertelen reakciók aránya a többihez képest nagyobb volt, amelynek valószínűleg technikai okai lehetnek, mivel a vizsgált RT-PCR assay-k közül ezeknek voltak a leghosszabb amplikonjai (*MMP3*: 110bp; *IL8*: 92 bp; 10. táblázat). Másfelől

ennek a jelenségnek lehet biológiai háttere is, például a *CAVII* gén CRC mintákban való jelentősen csökkent expressziója.

A transzkriptumok többsége (10/11 marker) fokozott expressziót mutatott a vastagbél-daganat kialakulása során. Korábbi irodalmi adatok alapján mindegyik gén összefüggésbe hozható vastagbél-daganatok kialakulásának folyamatával. A transzkriptumok más daganattípusokon történő együttes vizsgálatára még nem került sor, emiatt a markerek malignus elváltozásra mutatott specifikussága a vastagbél-szöveti mintákon belül értelmezendő, vastagbél-rák kimutatására alkalmas markerekként.

Az Interleukin 1 béta (*IL1B*) az angiogenezist, a malignus sejtek invazivitását és a pro-inflammatórikus citokinek termelését serkenti [148]. A gén -31T/C polimorfizmusa a CRC kialakulásával [149] és kiújulásával is [150] összefüggésbe hozható, az *IL1B*-511 heterozigótákban és T hordozókban ugyanis a CRC kialakulása csökkent kockázatú [149]. Az *IL1B* a túlélő ráksejtek fennmaradásában és proliferációjában játszik szerepet [151]. Az *IL1RN* polimorfizmus szintén kapcsolatba hozható a CRC kialakulásával is [152]. Az interleukin 8 (*IL8*), amelynek fokozott expresszióját már leírták CRC-ben, a proliferációt, a metasztázis képzést és az angiogenezist támogatja, továbbá ismert, hogy e gén kiütése gátolja a tumoros növekedést és az áttétképződést is [153, 154]. A gremlin-1 (*GREM1*) gén fokozott kifejeződését számos daganattípusban kimutatták, köztük hasnyálmirigy-rákban, emlődaganatban, vesedaganatban, ovárium és vastagbél-daganatokban egyaránt [155]. A gremlin-1 fehérje szekréciója a tumorképződést a sejtproliferáció fokozásán keresztül serkenti [156]. *CXCL2* (más néven Gro2) már rákmegelőző állapotokban és CRC-ben is növekedett kifejeződésű [157], és ezenkívül egér transzplantációs modellben a tumorsejt növekedést is fel tudja gyorsítani [158]. A kollagén XII alfa 1 (*COL12A1*) géntermékét a CRC invazív frontján jellemző miofibroblaszt sejtek differenciációs markerekként napjainkban azonosították [159]. Fokozott működését egy humán sporadikus tumorból létrehozott egérmódeljéből izolált CRC-hez kapcsolt kolorektális karcinoma-asszociált fibroblaszt sejtekben is megfigyelték [160]. A kitináz 3 fehérjeszerű 1 (*CHI3L1*, más néven HCgp39 vagy YKL-40) egy szekretált glikoprotein, amely fiziológiai körülmények közt nem termelődik, csak gyulladásos vagy daganatos állapotban [161, 162]. Fontos szerepe van a makrofágok toborzásában és a CRC kialakulása közben lezajló angiogenezisben is [163]. Egy napjainkban közölt tanulmány alapján ez a marker CRC-s betegek

utánkövetésére lehet alkalmas, mivel a megnövekedett szérumban a YKL-40 szint a rövidebb túlélési idővel mutat összefüggést [164]. Egy korábbi tanulmány szerint az SLC 7. család 5. tagja (*SLC7A5*) fehérje fokozott expressziója a normális mintában tapasztalt szinthez képest adenómában háromszoros, tumorban az ötszörös volt [165]. A karbon-anhidráz 7 a sav-bázis egyensúly fenntartását, kalcifikációt és a Zn^{2+} ion függő CO_2 hidratációt befolyásolja. A közelmúltban megjelent irodalmi adatok rávilágítottak arra is, hogy a *CA7* csökkent kifejeződése összefüggésbe hozható a vastagbél-daganatok kialakulásával [166]. Az alapján, hogy a *CA7* transzkriptum szintje fokozatosan csökken a tumor kialakulása során, továbbá a promóter régiójában azonosítható nagykiterjedésű CpG-denz régió alapján feltételezhető annak lehetősége, hogy a *CA7* gén DNS metilációs szabályozás alatt áll. A kemokin ligandum 1 (*CXCL1* más néven *Gro α*) gén egy szekretált interleukin-szerű molekulát kódol, amely speciálisan a G-fehérjékhez kapcsolt *CXCR2* receptorhoz kötődik [167] és feltételezhetően szerepet játszik a nem kissejtes tüdő-daganatok kialakulása során zajló angiogenezisben [168]. A gén fokozott működését melanómában [169] és CRC-ben is leírták, ahol a fehérje és az mRNA szintű változások jól korreláltak egymással [170, 171]. A mátrix-metalloproteináz-3 (*MMP3*) vastagbél-daganatokban jellemzően magas kifejeződésű, a gén által kódolt fehérje fontos szerepet játszik a tumor terjedés, a nyirokcsomó és a távoli áttétképzés szempontjából [172].

6.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákból

6.2.1 Automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

A rutin patológiai vizsgálatok során elemzett szövetminták automatikus kezelése különböző molekuláris biológiai vizsgálat bevezetése szempontjából kulcsfontosságú lehet. A nukleinsav izoláló automatáknak a megfelelő RNS/DNS kihozatal mellett jól reprodukálható módon biztosítani kell a megfelelő tisztaságot és a lehető legnagyobb nukleinsav integritást.

Az automata nukleinsav izoláló módszereket a standard kézi izoláláshoz hasonlítva elmondható, hogy a manuálisan kivont nukleinsav minták jobb mennyiségi és minőségi jellemzőkkel bírnak. A friss fagyasztott műtéti mintákból izolált DNS mennyisége nem tért el lényegesen a két módszer alkalmazása során, de a biopsziás és FFPE minták esetén az automata módszerrel szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A fenti

megfigyelés egyezik az irodalmi adatokkal egyezik, más összehasonlító vizsgálatok is arról számoltak be, hogy például teljes vérminták izolálása esetén is magasabb DNS kihozatalt eredményezett a hagyományos manuális izolálás, mint az automatizált rendszerek. A két izolálási módszer különböző DNS kihozatalt eredményezett a különböző szövetmintákból. A friss fagyasztott műtéti mintáknál tapasztalt közel azonos mennyiségekkel ellentétben, a biopsziás és az FFPE minták esetén a manuális módszerekkel kapott mennyiségeknek hozzávetőlegesen 50%-át érte el. Ennek ellenére a tapasztalataink alapján állítható, hogy az automata izolálás minden minta esetén legalább 1 µg DNS-t eredményezett, amely a molekuláris biológiai vizsgálatok döntő többségéhez megfelelő kiindulási mennyiség. Eredményeink szerint az automatizált izolálási protokoll kisebb szórású DNS kihozatalt eredményezett, amely előnyös lehet a kézi izolálással szemben. Az izolált nukleinsavak tisztasági értékei meghatározhatják a minták további vizsgálatokban való alkalmazhatóságát. A friss fagyasztott és a biopsziás szövetmintákból kivont DNS minták többsége megfelelő OD260/280 arányokkal rendelkezett, míg az FFPE szövetekből manuálisan izolált DNS minták után magasabb OD260/280 aránnyal rendelkeztek. Az OD260/230 arányok a friss fagyasztott minták esetén hasonlóak, a biopsziák és az FFPE minták esetén eltérőek voltak a két izolálási módszert követően.

A mennyiségi és minőségi paramétereken kívül a kivont nukleinsavak integritása is fontos tényező, amely közvetlenül befolyásolja a további molekuláris biológiai vizsgálatok sikerességét. A nukleinsav roncsolódást okozó formalin-fixáláson átesett FFPE minták esetén ez kifejezetten fontos tényező lehet. A vizsgált minták felében a kézi izolálás eredményezett nagyobb integritást, míg a többi minta ebből a szempontból hasonló volt mindkét izolálás után.

Munkánk során az izolált nukleinsavak DNS metilációs vizsgálatokban való alkalmazhatóságát teszteltük. A minták többségében hasonló DNS metilációs eredményeket kaptunk mindkét izolálási módszerrel kivont DNS kiindulási anyagként való felhasználása esetén. Az *SFRP1* és *SFRP2* gének DNS metilációs százalécai hasonlóan bizonyultak mint a fagyasztott, mind az FFPE minták esetén. A *MAL* gén DNS metilációs eredményei nagy szórást mutattak, amely rámutat annak jelentőségére, hogy az FFPE minták használatánál további optimalizációs lépések lehetnek szükségesek, mint például az amplikonhossz csökkentése.

Eredményeinket összefoglalva, a MagNA Pure 96 automata és a Qiagen kézi izolálási módszer összevetésével megmutattuk, hogy a hagyományos manuális izolálást magasabb nukleinsav mennyiséget és minőséget eredményez, és használatával az FFPE minták is megbízhatóbban elemezhetőek. A fentiek ellenére az automatikusan kivont DNS minták is megfelelő kihozattal és tisztasággal rendelkeztek ahhoz, hogy további DNS metilációs szint meghatározásra alkalmazhatóak legyenek. Bár a kihozatal az FFPE minták esetén is megfelelő volt, a tisztasági értékek limitálóak lehetnek ennél a mintatípusnál. Összességében a nagy áteresztőképességű laboratóriumok rutin feladatai számára a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszer megfelelő segítség lehet a biopsziás és a friss fagyasztott műtéti szövetekből történő DNS izoláláshoz.

6.2.2 Markerek kiválasztása DNS metilációs vizsgálatokra

Jelen vizsgálat során célunk az volt, hogy felderítsük a vastagbél-daganatok kialakulása során megjelenő génexpressziós változások háttérében lévő DNS metilációs és miRNS expressziós változásokat. A fenti cél elérése érdekében teljes genom génexpressziós vizsgálatokat, DNS metilációs vizsgálatokat, *in silico* predikciót és miRNS expressziós elemzést végeztünk.

Vizsgálatunk során 18 olyan transzkriptumot azonosítottunk, amely folyamatos génexpresszió változást mutat a CRC progressziója során. A microarray kísérletek alapján olyan 12 gént (*BCL2*, *CDX1*, *CYP27B1*, *ENTPD5*, *MAL*, *PRIMA1*, *PTGDR*, *PTGS2*, *SFRP1*, *SOCS3*, *SULT1A1*, és *TIMP1*) határoztunk meg, amelyek szignifikánsan változó transzkripcionális aktivitással rendelkeztek az adenoma mintákban az éphez képest, míg 6 további mRNS kifejeződése (*ALDH1A3*, *COL1A2*, *FADS1*, *SFRP1*, *SULF1* és *THBS2*) csak a tumoros mintákban mutatott jelentősen eltérő expressziót. A vastagbélhámot közelebbről megvizsgálva azt figyeltük meg, hogy adenomákban csökkent a *SOCS3* és a *PRIMA1* kifejeződése, míg daganatokban a *BCL2*, a *CYP27B1*, a *COL1A2*, a *FADS1* és a *SULT1A1* gének mutatnak csökkenő expressziót. A HT-29 humán vastagbélkarcinoma sejtek demetilációs kezelése az általunk vizsgált markerek minimális expressziós változásához vezetett, egyedül a *PTGS2* mutatott jelentős (1-nél nagyobb log fold) változást. A demetilációs kezelés további beállítása, egyéb CRC sejtvonalak alkalmazása és további szabályozó mechanizmusok figyelembe

vétele segíthetné a promóter metiláció és a génexpresszió közti kapcsolat pontosabb feltárását.

A kiválasztott markerek közül a *COLIA2*, az *SFRP2* és a *SOCS3* gén hipermetilált, a *THBS2* hipometilált volt mind adenomákban, mind tumorokban a normál adjacens mintákhoz képest. Irodalmi adatok alapján a *COLIA2* hipermetilációja fejnyaki rákokban [173], melanómákban [174] és hólyagrákban [175] már leírt jelenség. Bizonyított, hogy a *COLIA2* számos daganat kialakulása során befolyásolhatja a sejtproliferációt és a migrációt. A gasztrointesztinális traktusban a *COLIA2* kifejeződése az epithelialis-mezenchimális átalakulással függhet össze [176]. Az onkogén átalakulás során a karcinoma kollagéntermelése csökken és a *COLIA2* gén hipermetilációját számos CRC sejtvonalban (HCT116, SW480 és SW620) és primer CRC-ben is igazolták [177, 178].

Az *SFRP2* gén a jól ismert Wnt jelátviteli útvonal inhibitorai közé tartozik, amelynek abnormális aktiválódása (például az APC mutáció miatt is bekövetkező béta-katenin áthelyeződés megváltozása) gyakori esemény a vastagbél-daganatok kialakulása során [179]. Az *SFRP2* gén DNS hipermetilációja CRC sejtvonalakban (például HCT116) és primer CRC-ben is jól dokumentált tény [180, 181]. Napjainkban a metilált *SFRP2*-t székletből kimutatható potenciális szűrőmarkerként azonosították, ezért további vizsgálata klinikailag is releváns lehet a jövőben [181].

A *SOCS3* a JAK-STAT3 jelítviteli útvonal negatív regulátora, így részt vehet a sejtciklus és a proliferáció szabályozásában is [182]. A gén mutációs elemzése során kiderült, hogy a *SOCS3* promóterében talált polimorfizmusok és a metasztatikus CRC kialakulása között nincs kapcsolat [183]. A *SOCS3* epigenetikai inaktivációját már humán malignus melanómákban [184] és glioblasztóma multiforme daganatokban [185] is leírták. Csökkent génexpresszióját colitis ulcerosa-ból (UC) kialakuló CRC mintákban figyelték meg. A *SOCS3* DNS metilációját kimutatták colitis ulcerosa-asszociált vastagbél-daganatokban, de egészséges kontrollokban és inaktív UC betegekben nem [186, 187].

A trombospondin-2 (*THBS2*) DNS hipermetilációja ovárium rákban és endometrium adenokarcinómban a gén csökkent kifejeződését okozhatja [188]. A trombospondin egy anti-angiogén faktor, amelynek megváltozott expressziója az érképződésnek és az áttétek kialakulásának befolyásolásával meghatározó lehet a CRC kialakulásában és

progressziójában [189]. Vizsgálataink eredményei alapján a *BCL2*, a *PRIMA1* és a *PTGDR* gének hipermetilációja csak CRC mintákban volt jellemző. A *BCL2* gén egy antiapoptotikus fehérjét kódol. Hipermetilációját emlődaganatokban [190] és hólyagrákban [191] már megfigyelték. A Bcl-2 fehérje bizonyítottan szerepet játszik a CRC kialakulásában és csökkent kifejeződése a mikroszatellita instabil CRC daganatokra jellemző [192, 193]. DNS hipermetilációját megfigyelték CRC mintákban, de a gén metiláltsága és kifejeződése közt összefüggés nem mutatkozott [194].

A *PRIMA1* gén egy olyan membránproteint kódol, amely acetilkolinésztert horgonyoz a sejtmembránokba [195]. A gén promóter metilációját major depresszióban tapasztalták, és a megváltozott metilációs szintet a génkifejeződés mértéke ellentétesen követte [196]. A fenti gén DNS metilációs eltéréseit vastagbél-daganatokban más kutatócsoportok még nem írták le.

A prosztaglandin D2 receptor vastagbél adenomákban és tumorokban csökkenő mRNS szintjét munkacsoportunk már korábban publikálta [197]. A DNS metilációs vizsgálatainkba bevont gének döntő többsége részt vesz valamely, a daganat kialakulásával összefüggésbe hozható sejt-folyamatban (17. táblázat).

17. táblázat. A DNS metilációs vizsgálatban elemzett gének csoportosítása a daganatok kialakulásával összefüggésbe hozható sejt-folyamatokban betöltött szerepük alapján.

Daganatok kialakulásával összefüggésbe hozható sejt-folyamat	Gén
Apoptózis szabályozás (serkentés)	<i>ALDH1A3, BCL2, MAL, SOCS3, SULF1, TIMP1</i>
Proliferáció szabályozás	<i>CYP27B1, ENTPD5, SFRP1, SFRP2,</i>
Transzkripció szabályozás	<i>CDX1, FADS1</i>
Ciklooxygenáz rendszer szabályozása	<i>PTGDR, PTGS2</i>
Extracelluláris mátrix alakítása	<i>COL1A2</i>
Angiogenezis	<i>THBS2</i>

Összegezve a *MAL*, a *PRIMA1*, a *PTGDR* és az *SFRP1* gének csökkenő génexpressziós szintjükkel párhuzamosan emelkedő DNS metilációs szintet mutattak a vastagbél-daganatok kialakulása során. Mindeközben a *BCL-2*, a *CDX-1*, a *ENTPD5* és a

SULT1A1 gének csökkenő kifejeződésével párhuzamosan emelkedő DNS metilációs szint nem volt megfigyelhető, ezért utóbbi gének megváltozott expressziós szintjének hátterében más szabályozó mechanizmust feltételezünk.

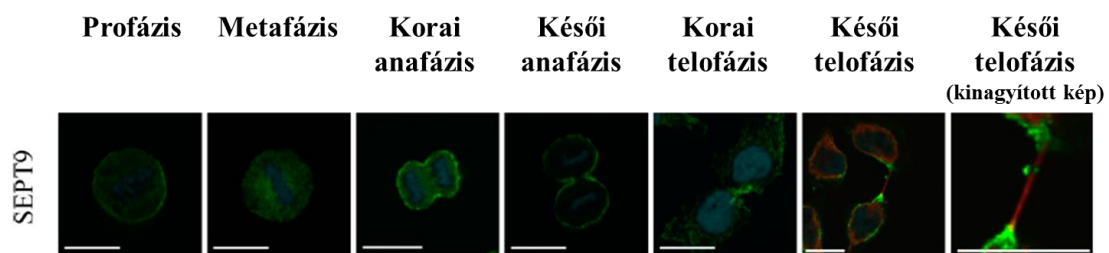
A változó kifejeződésű gének DNS metilációs vizsgálata után a fehérjetermékek szintjét is megvizsgáltuk. Immunhisztokémiai vizsgálatokat két marker esetén volt lehetőségünk végezni. Az SFRP1 (szekretált frizzled-rokon fehérje 1) fehérje kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során csökkenő kifejeződését igazoltuk. A fenti megfigyelésünk összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint a gén epigenetikai szabályozása alacsony fehérjeszintet eredményez különböző szolid daganatokban [198, 199]. A prosztaglandin D2 receptor az SFRP1 fehérjéhez hasonló csökkenő kifejeződést mutatott a vastagbél ép-adenoma-karcinoma átmenet során.

Vizsgálatunk során olyan miRNS-eket is azonosítottunk, amelyek az adenoma és karcinoma mintákban felülszabályozódnak. Ilyen volt a daganatokban általánosan előforduló ún.miR-21 onkomiR, amely szignifikánsan ($p < 0,01$) emelkedett kifejeződést mutatott adenoma és karcinoma állapotokban az adjacens normális mintákhoz képest. A fenti jelenség ráirányítja a figyelmünket arra, hogy ezen miRNS mRNS célpontjai jelentős DNS metilációs szint eltérések nélkül (például a *BCL2*, a *MAL* és a *PTGS2* gének esetén) is hasonlóképpen csökkent mértékben fejeződhetnek ki. A miR-21 számos daganattípusban ismert, meghatározó szerepet játszó miRNS, amely CRC-ben is fokozott kifejeződésű [200, 201]. Irodalmi adatok szerint a miR-181 a Bcl-2 család tagjait célozza, és a normális mintákhoz képest ugyancsak fokozottan expresszálódik CRC szövetmintákban [202].

6.3 A SEPT9 gén DNS metilációs szintje vastagbéliszövetben

A *SEPT9* gén DNS metilációs szintje fontos klinikai előszűrési jelentőséggel bír. Vizsgálatunk során a *SEPT9* gén összesen 8 régióját vizsgáltuk egészséges, adenoma és CRC mintákon, valamint a tumor mellől mintavételezett mikroszkópiusan normális szövetek hám és stroma sejtjein. A legnagyobb DNS metilációs szint eltéréseket a normális és a kóros vastagbéliszövetek között a harmadik CpG sziget esetén találtunk (CGI3). A lézer mikrodisszektált minták eredményei alapján feltételezhető, hogy az irodalomban is leírt [203], jelentős DNS metilációs változások elsősorban a hámsejtekből eredtek, míg a stromasejtek kismértékű változása csak a hámsejtek változását követően volt jellemző. Megfigyeltük a tumorokban jelentkező DNS

metiláció 5' vég felé való terjedését is, ami az adenoma mintákra nem volt jellemző. A fentiek alapján feltételezhető, hogy a CGI3 metilációs szintjének változása a malignus átalakulás felé fontos biológiai folyamat lehet. Ez a folyamat valószínűleg a korai szakaszában végbemegy és közvetlenül befolyásolhatja a tumor kialakulását. A kötőszöveti sejtek fontos szerepet tölthetnek be a tumor mikrokörnyezetének kialakításában. A stromális sejtek változásai valószínűleg a hámsejtek változásait követően történnek a malignus átalakulás során. A vastagbél tumorok hám és stromális sejtjei a normál szövetben is alapvetően eltérő funkciókat látnak el és irodalmi adatok szerint a kialakult tumorban is eltérő változások zajlanak le bennük [204]. Ezek közül az epigenetikai különbségek is jelentősek a két sejt típus között [205-207]. Annak pontos mechanizmusa, hogy az egyik sejt epigenetikai változása hogyan idéz elő változást egy másik sejtben egyelőre nem ismert, de minden bizonnyal egy komplex folyamat eredménye, amelyben a bazális membrán, az extracelluláris mátrix, a növekedési faktorok és citokinek, valamint a direkt sejt-sejt kapcsolatok egyaránt szerepet játszhatnak [208, 209]. Egy sejt malignizálódásához és invazivitásához első lépésben szükség van a bazális membrán proteolitikus degradációjára és az aktív migrációra. A Septin 9 fehérje a sejtosztódás során létrejövő két utódsejt szétfűződése során játszik fontos szerepet (34. ábra), így elképzelhető, hogy a tumorok kialakulása során tapasztalható megnövekedett DNS metilációs szintje és az ezzel párhuzamosan lecsökkenő fehérjeszintje közvetlen hatással lehet a sejt vándorlásra és az invazivitásra is.



34. ábra: A Septin 9 fehérje kifejeződése HeLa sejtekben a sejtosztódás különböző fázisaiban. Immunhisztokémiai jelölések: kék = DNS, zöld = Septin 9 fehérje, piros = alfa-tubulin. A méretjelzések 17 μm -nek felelnek meg. Az ábra Estey és munkatársai alapján, módosítva készült [210].

A fentieket támasztja alá a Septin 9 epiteliális-mezenchimális átalakulásra gyakorolt hatása is [211]. A *SEPT9* gén számos transzkripciós variánssal rendelkezik, ezek egy része feltehetőleg a sejt normális funkcióihoz szükségesek. Ha a tumorképződés során végbemenő DNS hipermetiláció módosítja egyes transzkriptumok kifejeződését, a megváltozó filamentumstruktúrák fontos sejtfolymatokat érinthetnek [78]. A CGI3 CpG sziget genomi elhelyezkedése és a transzkripciós start hely jelenléte is erősen arra utalhat, hogy a hipermetiláció a 2-es számú transzkripciós variáns kifejeződését befolyásolhatja. További kísérletek feladata lesz kideríteni azt, hogy a jelen vizsgálatban elemzett mintákban a megváltozott DNS metilációs szint milyen hatással van az egyes transzkripciós variánsok kifejeződésére.

A vizsgálat végeredménye szerint az Európában már CE engedéllyel rendelkező *SEPT9* metilációt vizsgáló, ún. Epi proColon 2.0 teszt éppen ezt a leginformatívabb szakaszt vizsgálja, amely a szöveti mintákban, azon belül is a lézer mikrodisszektált hámsejtekben a legnagyobb DNS metilációs különbséget mutatja.

Az általunk alkalmazott Septin 9 fehérjére specifikus poliklonális antitest a C terminális vég felé elhelyezkedő 29 aminosav régió kimutatására alkalmas, ez a szakasz összesen 7 Septin 9 izoformában konzervált. A fehérjeszint elemzés eredménye szerint a megnövekedett DNS metilációs szinttel párhuzamosan jelentős Septin9 fehérjeszint csökkenés észlelhető vastagbél adenoma és tumoros szövetekben. Természetesen a DNS hipermetiláció önmagában nem magyarázza meg a fehérjeszinten tapasztalható változást, ahhoz valószínűleg egyéb faktorok változása is szükséges. Ez a stromális sejtek esetén is látszik, ahol kevésbé kifejezett DNS metilációs változás mellett is alacsony fehérjeszint figyelhető meg. Ezen kívül a NAT1 mintákban tapasztalható hámsejt hipermetiláció nem tükröződik a fehérjeszint változásában. Egy korábbi vizsgálatban a használt ellenanyag a fehérje N terminus felőli régiójának kifejeződését vizsgálta, a Septin 9 fehérjeszint csökkenése szintén jelentkezett a vastagbél-daganatok kialakulásával párhuzamosan [203].

A jelentős DNS metilációs változásokat mutató 3. CpG sziget mellett további régiók is metilálódhatnak különböző tumorok kialakulása során. Például emlődaganatban emelkedett össz *SEPT9* mRNS szint mellett emelkedett fehérjeszint volt megfigyelhető az ép emlőszövetek mintákhoz képest. Emellett a 3. transzkripciós variáns és a hozzá kapcsolódó fehérjeszint csökkenését tapasztalták. A NAT1 és tumor mintákban

tapasztalt megemelkedett metiláció lehet felelős ezért a hatásért. Ez a régió viszont CpG szegény szakasz, a tv3 első exon-ja előtt helyezkedik el. Ez a mi vizsgálatunkban kb 3 kb upstream helyezkedik el a 3. amplikontól, amely a normál és tumoros minták közt csupán 12%-os metilációs eltérést mutatott, míg a CGI3 központi régiójában ez a különbség 80%-os volt. További vizsgálatok feladata választ adni arra a kérdésre, hogy a különböző daganattípusokban jelentkező DNS metilációs változások a SEPT9 mely régióját érintik.

A vizsgálatunkban talált karakterisztikus DNS metilációs változást mutató szakasz metilációs szintjét összehasonlítottuk nyilvánosan elérhető adatbázisok eredményeivel [212]. Új generációs szekvenálás technikával szintén erősen metiláltak találtuk a terület hámsejtekben, míg stromális sejtekben eredményeinkhez hasonlóan alacsony DNS metilációs szintek voltak kimutathatóak.

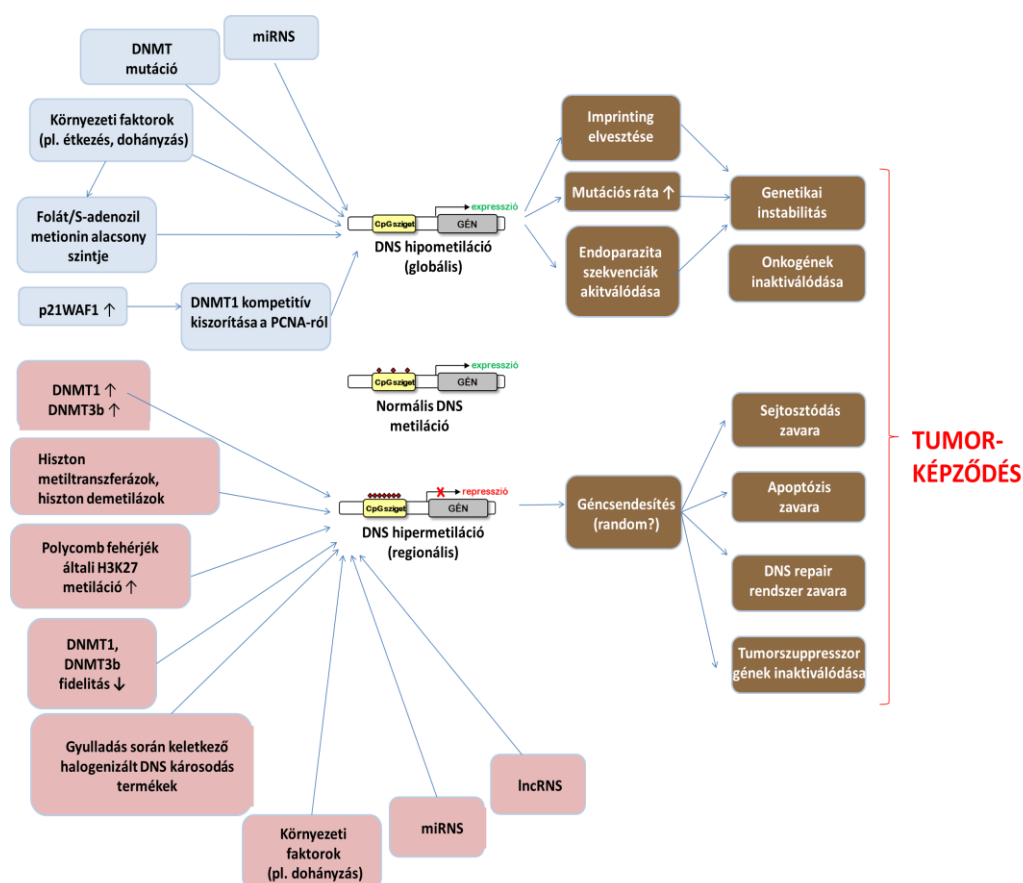
6.4 Az aberráns DNS metiláció okai és következményei

Bár az aberráns DNS metilációs szinteket mutató gének listája idővel egyre bővül, a jelenség mögött álló, megváltozott szabályozási mechanizmusokról azonban keveset tudunk, amely feltételezhetően főként az epigenetikai folyamatok kölcsönhatásának komplexitásából fakad.

A normális szinthez képes alacsonyabb DNS metilációt befolyásolhatja a metil-donor, azaz a S-adenozil-L-metionin hiánya, amelyet állatkísérletekben bizonyítottak [213]. Ezen kívül egy olyan elmélet is napvilágot látott, amely szerint a *p21WAF1* kifejeződés is hatással lehet az aberráns metiláció kialakulásához. A fenntartó metilációt kialakító DNMT1 enzim az ún. proliferáló sejt nukleáris antigénhez (PCNA) kötődik, amely kötődés a sejtciklus S fázisában a DNMT1 enzimek replikációs komplexhez való irányításáért felel. A p21WAF1 fehérje -amelynek fokozott működését például hepatocelluláris karcinómában is leírták [214]- is képes a PCNA-hoz kapcsolódni, így feltételezhető, hogy a DNMT1 enzimek helyét kompetitíven elfoglalva a PCNA kötőhelyén csökkent DNS metilációs szintet eredményez [33].

Az egyik megközelítés a DNS metiláció ún. szelektív irányítottságának (targetálásának) elmélete. A fokozott DNS metilációs szint megjelenése mögött egyrészt a DNMT enzimek megnövekedett kifejeződését feltételezhetjük. Több daganattípushoz hasonlóan vastagbélrákban is a metilációt végrehajtó enzimek fokozott expresszióját találták a normális szövethez hasonlítva [215]. Állatkísérletek is bizonyítják, hogy a DNMT1 és a

DNMT3b fokozott kifejeződése mellett a vad típusú állatokétól eltérő DNS metilációs mintázatok alakulnak ki [216]. Bár az enzimek fokozott mennyisége is bizonyára hatással van a DNS metiláció szintjére, azonban ez önmagában nem elegendő, valószínűbb, hogy a DNS metiláció irányítottságának (targetálásának) zavara állhat a háttérben. A fenti folyamat a hiszton módosító enzimek, mint például a hiszton metiltransferázok és hiszton demetilázok (EHMT2, PRMT5) működésével összhangban történik. A polycomb fehérjék által közvetített H3K27 metiláció szintén szerepet játszik a metiláció irányításában, így zavara szintén közrejátszhat az aberráns DNS metiláció kialakításában [217, 218]. Egy másik lehetséges elmélet szerint nem a DNMT enzimek emelkedett mennyisége vagy aktivitása, inkább az enzimek csökkent fidelitása vezethet aberráns DNS metilációs mintázatok kialakulásához. Korábbi vizsgálatok szerint a daganatos sejtekben a DNMT enzimek csökkent pontossággal működnek az Alu repetitív szekvenciáknál és a promóter asszociált CpG szigetekben is [219].



35. ábra. Az aberráns DNS metiláció okai és következményei. Részletes magyarázat a szövegben található.

Egy további szabályozó folyamat lehet a DNS metilációt fiziológias esetben megakadályozó barrier elemek hibája is. A barrier elemek DNS szakaszokat és a hozzájuk kötődő fehérjék együttesét foglalják magukba, amelyek a genomiális szakaszt megvédik a DNS hipermetilációtól. Ezek közé tartozik a DNS polimeráz III enzim általi sztérikus lefoglaltság, valamint azon DNS szakaszok, amelyekhez hisztonok, SP1 transzkripciós faktor vagy ún. VEZF1 cink-ujj DNS kötő fehérje kapcsolódhat [220]. Az ún. DNS szomszéd hatás elmélet szerint az erősen metilált szekvenciák környezetében a DNS metiláció „terjedése” jellemző [221].

A szelektív irányítottság (targetálás) mellett az aberráns DNS metiláció kialakulását segítő szelektív előnyre is több bizonyíték áll rendelkezésre. Az elmélet szerint a daganatsejtekben olyan gének aberráns DNS metilációját találjuk a daganatsejtekben, amelyek csendesítése által a sejt növekedési és túlélési előnyhöz juthatott a karcinogenezis során [222].

A környezeti hatások (például a környezeti karcinogének), illetve az élvezeti szerek (mint például az alkoholfogyasztás vagy a dohányzás) is bizonyítottan aberráns metilációt eredményeznek [223].

Egy további lehetséges DNS metilációt szabályozó folyamat lehet még a gyulladás során keletkező halogenizált DNS károsodás termékei, amelyek mimikálhatják az 5-mC-t és a metil-kötő fehérjékhez nagy affinitással kötődhetnek, így a replikáció során keletkező szálon az eredeti DNS metilációs mintázattól eltérő, aberráns metiláció jelenhet meg [224].

A nemkódoló RNS-ek szintén befolyásolhatják a DNS metilációt. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arról, hogy a miRNS-ek direkt vezérelhetik a DNS metilázokat [225]. Érdekesség, hogy a DNS metiláció pedig csendesítheti a miRNS kifejeződését, amely szintén fontos szabályozó folyamat [226]. Hasonlóképpen a hosszú, nemkódoló RNS-ek (lncRNS) is irányíthatják a DNS metiláció folyamatát.

A fent említett elméletekből is egyértelmű, hogy a különböző epigenetikai folyamatok kölcsönhatásának eredője fogja meghatározni az adott sejt jövőjét, és amennyiben a bekövetkezett változás túlélési és szaporodási előnyökkel szolgál, ez a tumorképződés kezdetét eredményezheti (35. ábra).

7 KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám eredményei alapján megállapítható, hogy az automatizált nukleinsav izolálási módszerek ideális alternatívát jelenthetnek nagy mintaszámot feldolgozó laboratóriumok számára. A vastagbél daganatok objektív osztályozásában segítséget nyújthatnak olyan génexpressziós markerek, amelyek alapján az egészséges és a vastagbél tumoros szövetmintákat lehetőség van elkülöníteni. Eredményeim azt mutatják, hogy a fenti megközelítéssel az automatizáltan feldolgozott FFPE minták is magas szenzitivitással és specificitással csoportosíthatóak. Az automatizált rendszerek a DNS kivonására szintén megfelelően alkalmazhatóak, az így feldolgozott minták további molekuláris vizsgálatok megfelelő alapjául szolgálhatnak. A génexpresszió változásai alapján lehetőség van potenciálisan DNS metiláció által szabályozott markerek azonosítására. A fenti összehasonlító módszerrel egy olyan géncsoportot azonosítottam, amelynek DNS hipermetilációja főként a vastagbél adenoma és tumoros hámsejtekben volt meghatározó. A *SEPT9* gén vizsgálata során megállapítottam, hogy vastagbél adenoma és CRC mintákban tapasztalt DNS hipermetiláció a gén promóter szakaszában található 3 nagyobb CpG sziget közül csak az egyikre korlátozódik, amely egybeesik a plazmaminták előszűrésére alkalmas Epi proColon 2.0 teszt által vizsgált szakasszal.

Összegezve elmondható, hogy az azonosított, DNS metiláció által szabályozott gének a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia mentén fontos szerepet tölthetnek be, így eredményeim hozzájárulhatnak a CRC korai felismeréséhez, a daganatképződés molekuláris hátterének pontosabb megismerésével potenciális jövőbeli terápiás célpontok azonosításához.

8 LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK

- A MagNA Pure 96 készüléssel automatizált módon elegendő mennyiségű és minőségű RNS kivonására van lehetőség biopsziás és FFPE mintákból egyaránt.
- Az általam vizsgált 11 tagú mRNS marker szett 96,7%-os szenzitivitással és 70%-os specificitással volt képes elkülöníteni az egészséges és a CRC FFPE szövetmintákat, így megállapítottam, hogy a CRC-specifikus transzkripciós szett megfelelően alkalmazható FFPE szövetanyagon is.
- Eredményeim szerint az automatikusan izolált DNS minták megfelelő kihozattal és tisztasággal rendelkeztek ahhoz, hogy további vizsgálatban alkalmasak legyenek DNS metilációs szint meghatározásra.
- Csökkenő génexpressziójuk alapján sikeresen azonosítottam olyan géneket, amelyek DNS hipermetilációs vagy miRNS szabályozás alatt állhatnak a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során
- A CRC kialakulása során csökkent génexpressziót és növekvő DNS metilációt mutató gének közül kettő esetében fehérjeszint csökkenést is igazoltam.
- Azokban a génekben, amelyek az adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során nem mutatnak jelentős DNS hipermetilációt, egyéb epigenetikai szabályozó mechanizmusok, többek között miRNS szabályozás feltételezhető.
- Biopsziás, friss fagyasztott műtéti és FFPE minták manuális és automatizált DNS izolálását követően hasonló DNS metilációs eredményeket kaptam.
- A *SEPT9* gén DNS metilációs szintjét elsőként vizsgáltam lézer mikrodisszekált ép, NAT, adenoma, és tumoros minták hám és stróma sejteiben.
- Megállapítottam, hogy a tumoros és adenoma mintákban a hámsejtek magas *SEPT9* DNS hipermetilációt mutatnak.
- Eredményeim alapján a *SEPT9* DNS hipermetiláció a gén promóter szakaszában található 3 nagyobb CpG sziget közül csak az egyikre korlátozódik, amely egybeesik a plazmaminták előszűrésére alkalmas Epi proColon 2.0 teszt által vizsgált szakasszal.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

9.1 Magyar összefoglaló

Bár a szűrővizsgálatok egyre nagyobb hangsúlyt kapnak, a vastagbél daganatok (CRC) nagy hányadának diagnózisa csak a tumor előrehaladott állapotában történik, mikor a túlélési esélyek jelentősen lecsökkentek. A CRC-t a fejlett nyugati világban, köztünk hazánkban kiemelkedően magas incidencia és mortalitás jellemzi. Annak ellenére, hogy napjainkra számos vizsgálat eredményeként egyre több ismeret halmozódik fel, a vastagbél-daganatok kialakulása során jelentkező molekuláris változások csak részben ismertek. Sokféle daganatos megbetegedés, köztük a CRC kialakulása során - a genetikai változások mellett - az epigenetikai szabályozó mechanizmusok megváltozott működése számos gén kifejeződésére hatással van. A leggyakrabban vizsgált epigenetikai jelenség a DNS metiláció, amelynek aberráns szintje az érintett gén csendesítéséhez vezethet. PhD munkámban egy korábban azonosított, vastagbél daganatokra specifikus transzkriptum szett alkalmazhatóságának vizsgálatát végeztem formalin-fixált, paraffinba-ágyazott (FFPE) szövetekből automatizált módon izolált RNS mintákon, a későbbi nagy átérésztőképességű vizsgálatok céljából. Ezen kívül a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során csökkenő kifejeződést mutató gének szabályozásának felderítése érdekében DNS metilációs vizsgálatokat végeztem vastagbél szövetmintákon, valamint ezekből lézer mikrodisszekció segítségével izolált hám- és strómasejteken, amely során a vastagbél adenomákra és tumorokra jellemző hipermetilált géneket azonosítottam. A DNS metiláció feltételezett negatív szabályozó hatását fehérjeszinten is vizsgáltam. PhD munkám összehasonlító módszertani vizsgálatait során megállapítottam, hogy az automatizált DNS kivonás jól reprodukálható és megbízható alternatívája lehet a hagyományos kézi DNS izolációs módszereknek. A CRC előszűrésre is használt hipermetilált *SEPT9* gén DNS metilációs szintjét is vizsgáltam vastagbél szövetmintákon, valamint hám- és strómasejteken. A *SEPT9* gén számos CpG szigete közül egyben tapasztaltam DNS hipermetilációt. Megállapítottam, hogy a *SEPT9* gén hipermetilációja adenoma és CRC szövetekben, azon belül is a hámsejtekben jellemző. A vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során megfigyelt szöveti *SEPT9* DNS metilációs szint emelkedésével párhuzamosan a Septin 9 fehérjeszint csökkenését tapasztaltam.

9.2 Angol összefoglaló

Although screening tests are becoming increasingly important, colorectal cancer (CRC), the diagnosis usually occurs at an advanced stage of the tumor, when chances of survival are greatly diminished. CRC in the developed Western world, including our country is characterized by extremely high incidence and mortality rates. Despite the fact that knowledge is accumulated continuously by several studies, molecular changes along colorectal adenoma-carcinoma formation only partially known. During the development of a variety of cancers - including CRC - in addition to genetic changes the altered function of epigenetic regulatory mechanisms affect many genes. The most studied epigenetic phenomenon is DNA methylation, which can lead to aberrant DNA methylation levels resulting in gene silencing.

In my PhD I analyzed the applicability of a previously identified colon cancer-specific transcript set on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples using RNA samples isolated automatically for future high-throughput studies.

In addition, DNA methylation tests were performed on colon tissue, as well as laser microdissected epithelial and stromal cells in order to identify genes potentially regulated by DNA methylation along colorectal adenoma – carcinoma sequence. The putative negative regulatory effect of DNA methylation was also investigated at the protein level, as well.

During my PhD, on the basis of comparative DNA extraction methods I found that automated DNA isolation can be a reproducible and reliable alternative to traditional manual methods. DNA methylation level of *SEPT9* gene - also used as a pre-screening marker of CRC - was examined in colon tissue and in colonic epithelial and stromal cells. Among many CpG islands of *SEPT9*, DNA hypermethylation was restricted to only one CpG region. According to the results of the laser microdissected cell types, *SEPT9* hypermethylation could be found predominantly in colon epithelial cells. Along colorectal adenoma- carcinoma sequence tissue *SEPT9* DNA methylation levels correlates with decreasing Septin 9 protein level.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Röchlich P. Szövettan. In. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió. Budapest, 2006.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, and Bos JL. (1988) Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*. 319(9): p. 525-532.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, and Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 49(6): p. 1374-1403.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61(2): p. 69-90.
5. Herszenyi L and Tulassay Z. (2010) Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 14(4): p. 249-58.
6. Ottó S and Kásler M. (2002) Rákmortalitás és -incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. *Magy Onkol*. 46(2): p. 111-7.
7. Fearon ER and Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61(5): p. 759-67.
8. Andrabi HaKI. (2014) Possible Role of Proto-Oncogenes in Colorectal Cancer — A Population Based Study, *Colorectal Cancer - Surgery, Diagnostics and Treatment*, D.J. Khan, Editor: InTech.
9. Goldstein NS. (2006) Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *Am J Clin Pathol*. 125(1): p. 146-53.
10. Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, and Hieter P. (2008) Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(9): p. 3443-8.
11. Goss KH and Groden J. (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*. 18(9): p. 1967-79.
12. Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, and Nagase H. (1991) Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp*. 22: p. 285-92.
13. Grady WM and Markowitz SD. (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3: p. 101-28.
14. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, and Markowitz S. (1998) Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res*. 58(14): p. 3101-4.
15. Fearon ER and Pierceall WE. (1995) The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer Surv*. 24: p. 3-17.

16. Roger L, Jones RE, Heppel NH, Williams GT, Sampson JR, and Baird DM. (2013) Extensive telomere erosion in the initiation of colorectal adenomas and its association with chromosomal instability. *J Natl Cancer Inst.* 105(16): p. 1202-11.
17. Gilad O, Nabet BY, Ragland RL, Schoppy DW, Smith KD, Durham AC, and Brown EJ. (2010) Combining ATR suppression with oncogenic Ras synergistically increases genomic instability, causing synthetic lethality or tumorigenesis in a dosage-dependent manner. *Cancer Res.* 70(23): p. 9693-702.
18. Grady WM and Markowitz SD. (2014) The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig Dis Sci.*
19. Bellizzi AM and Frankel WL. (2009) Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function A Review. *Advances in Anatomic Pathology.* 16(6): p. 405-417.
20. Peltomaki P. (1997) DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 4: p. 775-80.
21. Edelmann L and Edelmann W. (2004) Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 129C(1): p. 91-9.
22. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, and Kerr D. (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 9(7): p. 489-99.
23. Walther A, Houlston R, and Tomlinson I. (2008) Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut.* 57(7): p. 941-50.
24. Grady WM. (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23(1-2): p. 11-27.
25. Okano M, Bell DW, Haber DA, and Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(3): p. 247-57.
26. Eden S and Cedar H. (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 4(2): p. 255-9.
27. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, and Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 19(2): p. 187-91.
28. Kondo Y. (2009) Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J.* 50(4): p. 455-63.
29. Esteller M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 8(4): p. 286-98.
30. Baylin SB and Herman JG. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16(4): p. 168-74.
31. Ahuja N and Issa JP. (2000) Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol.* 15(3): p. 835-42.
32. Issa JP. (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4(12): p. 988-93.
33. Strathdee G and Brown R. (2002) Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.* 4(4): p. 1-17.

34. Patai AV, Molnar B, Kalmar A, Scholler A, Toth K, and Tulassay Z. (2012) Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis.* 30(3): p. 310-5.
35. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, and Issa JP. (2005) MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97(18): p. 1330-8.
36. Luo Y, Yu M, and Grady WM. (2014) Field cancerization in the colon: a role for aberrant DNA methylation? *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2(1): p. 16-20.
37. Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, Toth K, Tulassay Z, Sledziewski AZ, and Molnar B. (2013) Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer.* 13: p. 398.
38. Astler VB and Collier FA. (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 139(6): p. 846-52.
39. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, and Hase K. (2012) New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 36(2): p. 193-201.
40. Atkin WS, Valori R, Kuipers EJ, Hoff G, Senore C, Segnan N, Jover R, Schmiegel W, Lambert R, Pox C, and International Agency for Research on C. (2012) European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Colonoscopic surveillance following adenoma removal. *Endoscopy.* 44 Suppl 3: p. SE151-63.
41. Watson AJ and Collins PD. (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis.* 29(2): p. 222-8.
42. Sharaf RN and Ladabaum U. (2013) Comparative effectiveness and cost-effectiveness of screening colonoscopy vs. sigmoidoscopy and alternative strategies. *Am J Gastroenterol.* 108(1): p. 120-32.
43. Riccioni ME, Urgesi R, Cianci R, Bizzotto A, Spada C, and Costamagna G. (2012) Colon capsule endoscopy: Advantages, limitations and expectations. Which novelties? *World J Gastrointest Endosc.* 4(4): p. 99-107.
44. Rokkas T, Papaxoinis K, Triantafyllou K, and Ladas SD. (2010) A meta-analysis evaluating the accuracy of colon capsule endoscopy in detecting colon polyps. *Gastrointest Endosc.* 71(4): p. 792-8.
45. Lieberman DA. (2009) Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 361(12): p. 1179-87.
46. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ, American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory G, Force USM-ST, and American College of Radiology Colon Cancer C. (2008) Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 58(3): p. 130-60.
47. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T, and Ishigamori R. (2010) Biomarkers for colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 11(9): p. 3209-25.
48. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, and Laurent-Puig P. (2008) KRAS

- mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 26(3): p. 374-9.
49. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, and Bardelli A. (2008) Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26(35): p. 5705-12.
 50. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, Taylor G, Barrett JH, and Quirke P. (2009) KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol.* 27(35): p. 5931-7.
 51. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, and Bishop DT. (2003) Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol.* 56(3): p. 137-40.
 52. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, and Gallinger S. (2003) Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 349(3): p. 247-57.
 53. Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, and Rochlitz C. (2002) SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 87(6): p. 630-4.
 54. Zhang Y, Suehiro Y, Shindo Y, Sakai K, Hazama S, Higaki S, Sakaida I, Oka M, and Yamasaki T. (2015) Long-fragment DNA as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 9(1): p. 454-458.
 55. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, and Kolodner R. (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57(5): p. 808-11.
 56. Luo L, Chen WD, and Pretlow TP. (2005) CpG island methylation in aberrant crypt foci and cancers from the same patients. *Int J Cancer.* 115(5): p. 747-51.
 57. Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, Schultenover S, Gautam S, Markowitz SD, and Grady WM. (2005) Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res.* 11(3): p. 1203-9.
 58. Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, Chapman WC, Washington MK, Willis J, Markowitz SD, and Grady WM. (2006) CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 45(8): p. 781-9.
 59. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, and Issa JP. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(15): p. 8681-6.
 60. Rashid A, Shen L, Morris JS, Issa JP, and Hamilton SR. (2001) CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 159(3): p. 1129-35.

61. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, and Kang GH. (2004) Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest.* 84(7): p. 884-93.
62. Lao VV and Grady WM. (2011) Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(12): p. 686-700.
63. Chen WD, Han ZJ, Skoletsy J, Olson J, Sah J, Myeroff L, Platzer P, Lu S, Dawson D, Willis J, Pretlow TP, Lutterbaugh J, Kasturi L, Willson JK, Rao JS, Shuber A, and Markowitz SD. (2005) Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst.* 97(15): p. 1124-32.
64. Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, and Hibi K. (2009) Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 29(1): p. 279-81.
65. Hellebrekers DM, Lentjes MH, van den Bosch SM, Melotte V, Wouters KA, Daenen KL, Smits KM, Akiyama Y, Yuasa Y, Sanduleanu S, Khalid-de Bakker CA, Jonkers D, Weijenberg MP, Louwagie J, van Criekinge W, Carvalho B, Meijer GA, Baylin SB, Herman JG, de Bruine AP, and van Engeland M. (2009) GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 15(12): p. 3990-7.
66. Lu H, Huang S, Zhang X, Wang D, Zhang X, Yuan X, Zhang Q, and Huang Z. (2014) DNA methylation analysis of SFRP2, GATA4/5, NDRG4 and VIM for the detection of colorectal cancer in fecal DNA. *Oncol Lett.* 8(4): p. 1751-1756.
67. Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, Schauer R, Brabletz T, Goke B, Lamerz R, and Kolligs FT. (2005) Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3(2): p. 142-9.
68. Ausch C, Kim YH, Tsuchiya KD, Dzieciatkowski S, Washington MK, Paraskeva C, Radich J, and Grady WM. (2009) Comparative analysis of PCR-based biomarker assay methods for colorectal polyp detection from fecal DNA. *Clin Chem.* 55(8): p. 1559-63.
69. Melotte V, Lentjes MH, van den Bosch SM, Hellebrekers DM, de Hoon JP, Wouters KA, Daenen KL, Partouns-Hendriks IE, Stessels F, Louwagie J, Smits KM, Weijenberg MP, Sanduleanu S, Khalid-de Bakker CA, Oort FA, Meijer GA, Jonkers DM, Herman JG, de Bruine AP, and van Engeland M. (2009) N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 101(13): p. 916-27.
70. Kim MS, Louwagie J, Carvalho B, Terhaar Sive Droste JS, Park HL, Chae YK, Yamashita K, Liu J, Ostrow KL, Ling S, Guerrero-Preston R, Demokan S, Yalniz Z, Dalay N, Meijer GA, Van Criekinge W, and Sidransky D. (2009) Promoter DNA methylation of oncostatin m receptor-beta as a novel diagnostic and therapeutic marker in colon cancer. *PLoS One.* 4(8): p. e6555.
71. Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, Muhlthaler M, Ofner D, Margreiter R, and Widschwendter M. (2004) Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet.* 363(9417): p. 1283-5.
72. Herbst A, Wallner M, Rahmig K, Stieber P, Crispin A, Lamerz R, and Kolligs FT. (2009) Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients

- with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 21(5): p. 565-9.
73. Ebert MP, Model F, Mooney S, Hale K, Lograsso J, Tonnes-Priddy L, Hoffmann J, Csepregi A, Rocken C, Molnar B, Schulz HU, Malfertheiner P, and Lofton-Day C. (2006) Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 131(5): p. 1418-30.
 74. Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, and Ito Y. (2007) Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep.* 18(5): p. 1225-30.
 75. Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Goke B, Lamerz R, and Kolligs FT. (2006) Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 12(24): p. 7347-52.
 76. Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Bai AH, Hui AJ, Chan FK, and Sung JJ. (2005) Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 100(10): p. 2274-9.
 77. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grutzmann R, Pilarsky C, and Sledziewski A. (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem.* 54(2): p. 414-23.
 78. Estey MP, Kim MS, and Trimble WS. (2011) Septins. *Curr Biol.* 21(10): p. R384-7.
 79. Sandrock K, Bartsch I, Blaser S, Busse A, Busse E, and Zieger B. (2011) Characterization of human septin interactions. *Biol Chem.* 392(8-9): p. 751-61.
 80. McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Johnston PG, and Russell SE. (2001) Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene.* 20(41): p. 5930-9.
 81. Peterson EA and Petty EM. (2010) Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin Genet.* 77(6): p. 511-24.
 82. Montagna C, Lyu MS, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, and Ried T. (2003) The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 63(9): p. 2179-87.
 83. Scott M, Hyland PL, McGregor G, Hillan KJ, Russell SE, and Hall PA. (2005) Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene.* 24(29): p. 4688-700.
 84. Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, and Russell SE. (2006) Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer.* 118(5): p. 1325-9.
 85. Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, Loffreda-Wren JL, Kalikin LM, and Petty EM. (2007) High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer Res.* 67(18): p. 8554-64.
 86. Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, Plinkert P, Herpel E, Smiraglia D, and Plass C. (2008) Frequently methylated tumor

- suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 68(12): p. 4494-9.
87. Hall PA and Russell SE. (2012) Mammalian septins: dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization. *J Pathol.* 226(2): p. 287-99.
 88. deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grutzmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, and Lofton-Day C. (2009) Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem.* 55(7): p. 1337-46.
 89. Payne SR. (2010) From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics.* 2(4): p. 575-85.
 90. Molnar B, Toth K, Bartak BK, and Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn.* 15(2): p. 171-84.
 91. Jin P, Kang Q, Wang X, Yang L, Yu Y, Li N, He YQ, Han X, Hang J, Zhang J, Song L, Han Y, and Sheng JQ. (2014) Performance of a second generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. *J Gastroenterol Hepatol.*
 92. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, and Vyzula R. (2009) MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer.* 8: p. 102.
 93. Nagy Z, Szabo DR, Zsippai A, Falus A, Racz K, and Igaz P. (2012) [Relevance of long non-coding RNAs in tumour biology]. *Orv Hetil.* 153(38): p. 1494-501.
 94. Bannister AJ and Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21(3): p. 381-95.
 95. Budczies J, Weichert W, Noske A, Muller BM, Weller C, Wittenberger T, Hofmann HP, Dietel M, Denkert C, and Gekeler V. (2011) Genome-wide gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer core biopsies using microarrays. *J Histochem Cytochem.* 59(2): p. 146-57.
 96. Ribeiro-Silva A, Zhang H, and Jeffrey SS. (2007) RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. *BMC Mol Biol.* 8: p. 118.
 97. Chung JY, Braunschweig T, and Hewitt SM. (2006) Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol.* 15(4): p. 229-36.
 98. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DT, and Jordan RC. (2002) Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol.* 15(9): p. 979-87.
 99. Bohmann K, Hennig G, Rogel U, Poremba C, Mueller BM, Fritz P, Stoerkel S, and Schaefer KL. (2009) RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods. *Clin Chem.* 55(9): p. 1719-27.
 100. Leong KJ, James J, Wen K, Taniere P, Morton DG, Bach SP, and Matthews GM. (2013) Impact of tissue processing, archiving and enrichment techniques on DNA methylation yield in rectal carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 95(3): p. 343-9.

101. Legres LG, Janin A, Masselon C, and Bertheau P. (2014) Beyond laser microdissection technology: follow the yellow brick road for cancer research. *Am J Cancer Res.* 4(1): p. 1-28.
102. Galamb O, Spisak S, Sipos F, Toth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenacs T, Valcz G, Tulassay Z, and Molnar B. (2010) Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br J Cancer.* 102(4): p. 765-73.
103. Mullis KB and Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: p. 335-50.
104. Rew DA. (2001) DNA microarray technology in cancer research. *European Journal of Surgical Oncology.* 27(5): p. 504-508.
105. Kubota K, Ohashi A, Imachi H, and Harada H. (2006) Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 72(8): p. 5311-7.
106. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12): p. 5463-7.
107. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, and Nyren P. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 242(1): p. 84-9.
108. Ronaghi M, Uhlen M, and Nyren P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science.* 281(5375): p. 363, 365.
109. Ronaghi M. (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11(1): p. 3-11.
110. Jorgensen S, Baker A, Moller S, and Nielsen BS. (2010) Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods.* 52(4): p. 375-81.
111. van Beers EH, Joosse SA, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst FB, Verhoef S, and Nederlof PM. (2006) A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer.* 94(2): p. 333-7.
112. Tost J, El abdalaoui H, and Gut IG. (2006) Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation analysis. *Biotechniques.* 40(6): p. 721-2, 724, 726.
113. Lewin J, Schmitt AO, Adorjan P, Hildmann T, and Piepenbrock C. (2004) Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics.* 20(17): p. 3005-12.
114. Scicchitano MS, Dalmas DA, Bertiaux MA, Anderson SM, Turner LR, Thomas RA, Mirable R, and Boyce RW. (2006) Preliminary comparison of quantity, quality, and microarray performance of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, and unfixed frozen tissue samples. *J Histochem Cytochem.* 54(11): p. 1229-37.
115. Kalmar A, Wichmann B, Galamb O, Spisak S, Toth K, Leiszter K, Tulassay Z, and Molnar B. (2013) Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods.* 59(1): p. S16-9.
116. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, and Schlumpberger M. (2007) Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One.* 2(12): p. e1261.

117. Fleige S and Pfaffl MW. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 27(2-3): p. 126-39.
118. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhoffer M, Aaltonen L, Orntoft TF, Quackenbush J, and Yeatman TJ. (2005) Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 23(15): p. 3526-35.
119. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, van de Velde C, Morreau H, Van Velthuysen L, Glas AM, Van't Veer LJ, and Tollenaar R. (2011) Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 29(1): p. 17-24.
120. Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, and Atkins D. (2004) Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol.* 22(9): p. 1564-71.
121. Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM, Guenther K, Siebenhaar R, Stremmel C, Matzel KE, Papadopoulos T, Kirchner T, Behrens J, Klein-Hitpass L, Stuerzl M, Hohenberger W, and Reingruber B. (2005) Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. *Int J Colorectal Dis.* 20(4): p. 353-62.
122. Gardina PJ, Clark TA, Shimada B, Staples MK, Yang Q, Veitch J, Schweitzer A, Awad T, Sugnet C, Dee S, Davies C, Williams A, and Turpaz Y. (2006) Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics.* 7: p. 325.
123. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, and Tsunoda T. (2001) Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.* 61(9): p. 3544-9.
124. Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, and Levine AJ. (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(12): p. 6745-50.
125. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, and Nakamura Y. (2002) Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene.* 21(26): p. 4120-8.
126. Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, and Meltzer SJ. (2002) Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene.* 21(31): p. 4855-62.
127. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, and Levine AJ. (2001) Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Research.* 61(7): p. 3124-3130.
128. Lascorz J, Forsti A, Chen B, Buch S, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Morak M, Schackert HK, Gorgens H, Schulmann K, Goecke T, Kloor M, Engel C, Buttner R, Kunkel N, Weires M, Hoffmeister M, Pardini B, Naccarati A, Vodickova L, Novotny J, Schreiber S, Krawczak M, Broring CD, Volzke H,

- Schafmayer C, Vodicka P, Chang-Claude J, Brenner H, Burwinkel B, Propping P, Hampe J, and Hemminki K. (2010) Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. *Carcinogenesis*. 31(9): p. 1612-9.
129. Elrasheid A. H. Kheirelseid NM, Michael J. Kerin. (2013) Clinical applications of molecular profiling in colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*. 3: p. 131-138.
 130. Kita H, Hikichi Y, Hikami K, Tsuneyama K, Cui ZG, Osawa H, Ohnishi H, Mutoh H, Hoshino H, Bowlus CL, Yamamoto H, and Sugano K. (2006) Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis. *Journal of Gastroenterology*. 41(11): p. 1053-1063.
 131. Kim JC, Kim SY, Roh SA, Cho DH, Kim DD, Kim JH, and Kim YS. (2008) Gene expression profiling: Canonical molecular changes and clinicopathological features in sporadic colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology*. 14(43): p. 6662-6672.
 132. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, and Becerra C. (2003) Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clinical Cancer Research*. 9(3): p. 931-946.
 133. Grade M, Hormann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, Simon R, Liersch T, Becker H, Difilippantonio MJ, Ghadimi BM, and Ried T. (2007) Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas (vol 67, pg 41, 2007). *Cancer Research*. 67(4): p. 1877-1877.
 134. Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, Kitahara O, Kameyama M, Murata K, Ishikawa O, and Nakamura Y. (2001) Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia*. 3(5): p. 395-401.
 135. Kwon HC, Kim SH, Roh MS, Kim JS, Lee HS, Choi HJ, Jeong JS, Kim HJ, and Hwang TH. (2004) Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 47(2): p. 141-52.
 136. Koehler A, Bataille F, Schmid C, Ruemmele P, Waldeck A, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, and Dietmaier W. (2004) Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage. *J Pathol*. 204(1): p. 65-74.
 137. Bianchini M, Levy E, Zucchini C, Pinski V, Macagno C, De Sanctis P, Valvassori L, Carinci P, and Mordoh J. (2006) Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol*. 29(1): p. 83-94.
 138. Groene J, Mansmann U, Meister R, Staub E, Roepcke S, Heinze M, Klaman I, Brummendorf T, Hermann K, Loddenkemper C, Pilarsky C, Mann B, Adams HP, Buhr HJ, and Rosenthal A. (2006) Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. *Int J Cancer*. 119(8): p. 1829-36.

139. Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M, Ishikawa O, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, and Furukawa Y. (2004) Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol.* 24(2): p. 305-12.
140. Kleivi K, Lind GE, Diep CB, Meling GI, Brandal LT, Nesland JM, Myklebost O, Rognum TO, Giercksky KE, Skotheim RI, and Lothe RA. (2007) Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses. *Mol Cancer.* 6: p. 2.
141. Ki DH, Jeung HC, Park CH, Kang SH, Lee GY, Lee WS, Kim NK, Chung HC, and Rha SY. (2007) Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 121(9): p. 2005-12.
142. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, and Orntoft TF. (2005) Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut.* 54(3): p. 374-84.
143. Kim K, Park U, Wang J, Lee J, Park S, Kim S, Choi D, Kim C, and Park J. (2008) Gene profiling of colonic serrated adenomas by using oligonucleotide microarray. *Int J Colorectal Dis.* 23(6): p. 569-80.
144. Galamb O, Gyorffy B, Sipos F, Spisak S, Nemeth AM, Miheller P, Tulassay Z, Dinya E, and Molnar B. (2008) Inflammation, adenoma and cancer: objective classification of colon biopsy specimens with gene expression signature. *Dis Markers.* 25(1): p. 1-16.
145. Garcia-Bilbao A, Armananzas R, Ispizua Z, Calvo B, Alonso-Varona A, Inza I, Larranaga P, Lopez-Vivanco G, Suarez-Merino B, and Betanzos M. (2012) Identification of a biomarker panel for colorectal cancer diagnosis. *BMC Cancer.* 12: p. 43.
146. Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisak S, Krenacs T, Toth K, Leiszter K, Kalmar A, Tulassay Z, and Molnar B. (2012) Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One.* 7(11): p. e48547.
147. Grabowski P, Maaser K, Hanski C, Stein H, Sturm I, Hopfenmuller W, Dorken B, Buhr HJ, Zeitz M, and Scherubl H. (2005) Prognostic value of multimarker analysis in stage III colorectal cancer: one step forward towards an individualized therapy decision. *Onkologie.* 28(8-9): p. 399-403.
148. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, and Apte RN. (2003) IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5): p. 2645-50.
149. Ito H, Kaneko K, Makino R, Konishi K, Kurahashi T, Yamamoto T, Katagiri A, Kumekawa Y, Kubota Y, Muramoto T, Mitamura K, and Imawari M. (2007) Interleukin-1beta gene in esophageal, gastric and colorectal carcinomas. *Oncol Rep.* 18(2): p. 473-81.
150. Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D, Manegold PC, Ning Y, Zhang W, and Lenz HJ. (2009) Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet Genomics.* 19(2): p. 95-102.
151. Miki C, Konishi N, Ojima E, Hatada T, Inoue Y, and Kusunoki M. (2004) C-reactive protein as a prognostic variable that reflects uncontrolled up-regulation of the IL-1-IL-6 network system in colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci.* 49(6): p. 970-6.

152. Viet HT, Wagsater D, Hugander A, and Dimberg J. (2005) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 14(4): p. 915-8.
153. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, Winder T, Yang D, LaBonte MJ, Wilson PM, Ladner RD, and Lenz HJ. (2011) Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer.* 128(9): p. 2038-49.
154. Ning Y, Labonte MJ, Zhang W, Bohanes PO, Gerger A, Yang D, Benhaim L, Paez D, Rosenberg DO, Nagulapalli Venkata KC, Louie SG, Petasis NA, Ladner RD, and Lenz HJ. (2012) The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Mol Cancer Ther.* 11(6): p. 1353-64.
155. Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, Kim TE, and Kim JW. (2006) The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer.* 6: p. 74.
156. Kim M, Yoon S, Lee S, Ha SA, Kim HK, Kim JW, and Chung J. (2012) Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS One.* 7(4): p. e35100.
157. Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, and Janssen KP. (2010) Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int J Colorectal Dis.* 25(5): p. 573-81.
158. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Menger MD, and Schilling MK. (2007) Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol.* 33(6): p. 803-11.
159. Karagiannis GS, Petraki C, Prassas I, Saraon P, Musrap N, Dimitromanolakis A, and Diamandis EP. (2012) Proteomic signatures of the desmoplastic invasion front reveal collagen type XII as a marker of myofibroblastic differentiation during colorectal cancer metastasis. *Oncotarget.* 3(3): p. 267-85.
160. Torres S, Bartolome RA, Mendes M, Barderas R, Fernandez-Acenero MJ, Pelaez-Garcia A, Pena C, Lopez-Lucendo M, Villar-Vazquez R, de Herreros AG, Bonilla F, and Casal JI. (2013) Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 19(21): p. 6006-19.
161. Mizoguchi E. (2006) Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 130(2): p. 398-411.
162. Eurich K, Segawa M, Toei-Shimizu S, and Mizoguchi E. (2009) Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation-associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 15(42): p. 5249-59.
163. Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, and Chiba T. (2012) Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene.* 31(26): p. 3111-23.

164. Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, and Nielsen HJ. (2002) High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer*. 95(2): p. 267-74.
165. Broussard EK, Kim R, Wiley JC, Marquez JP, Annis JE, Pritchard D, and Disis ML. (2013) Identification of putative immunologic targets for colon cancer prevention based on conserved gene upregulation from preinvasive to malignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 6(7): p. 666-74.
166. Chu CM, Yao CT, Chang YT, Chou HL, Chou YC, Chen KH, Terng HJ, Huang CS, Lee CC, Su SL, Liu YC, Lin FG, Wetter T, and Chang CW. (2014) Gene expression profiling of colorectal tumors and normal mucosa by microarrays meta-analysis using prediction analysis of microarray, artificial neural network, classification, and regression trees. *Dis Markers*. 2014: p. 634123.
167. Wang D, Yang W, Du J, Devalaraja MN, Liang P, Matsumoto K, Tsubakimoto K, Endo T, and Richmond A. (2000) MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene*. 19(40): p. 4647-59.
168. Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, and Strieter RM. (1997) The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol*. 62(5): p. 554-62.
169. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, and Richmond A. (1997) Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol*. 62(5): p. 588-97.
170. Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, Richmond A, Strieter R, Dey SK, and DuBois RN. (2006) CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med*. 203(4): p. 941-51.
171. Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, Liu H, Shia J, Amenta PS, Barany F, Paty P, Gerald W, and Notterman D. (2006) GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res*. 12(20 Pt 1): p. 5951-9.
172. Islekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, Fuzun M, and Kupelioglu A. (2007) Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct*. 25(4): p. 433-41.
173. Misawa K, Kanazawa T, Misawa Y, Imai A, Endo S, Hakamada K, and Mineta H. (2011) Hypermethylation of collagen alpha2 (I) gene (COL1A2) is an independent predictor of survival in head and neck cancer. *Cancer Biomark*. 10(3-4): p. 135-44.
174. Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, Moser RJ, Boyle GM, Aoude LG, Schmidt C, and Hayward NK. (2011) Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. *PLoS One*. 6(10): p. e26121.
175. Mori K, Enokida H, Kagara I, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, and Nakagawa M. (2009) CpG hypermethylation of collagen type I alpha 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. *Int J Oncol*. 34(6): p. 1593-602.
176. Sadler T, Scarpa M, Rieder F, West G, and Stylianou E. (2013) Cytokine-induced chromatin modifications of the type I collagen alpha 2 gene during

- intestinal endothelial-to-mesenchymal transition. *Inflamm Bowel Dis.* 19(7): p. 1354-64.
177. Dahlman T, Lammerts E, Bergstrom D, Franzen A, Westermark K, Heldin NE, and Rubin K. (2002) Collagen type I expression in experimental anaplastic thyroid carcinoma: regulation and relevance for tumorigenicity. *Int J Cancer.* 98(2): p. 186-92.
 178. Sengupta PK, Smith EM, Kim K, Murnane MJ, and Smith BD. (2003) DNA hypermethylation near the transcription start site of collagen alpha2(I) gene occurs in both cancer cell lines and primary colorectal cancers. *Cancer Res.* 63(8): p. 1789-97.
 179. Cancer Genome Atlas N. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 487(7407): p. 330-7.
 180. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, and Baylin SB. (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet.* 36(4): p. 417-22.
 181. Wang DR and Tang D. (2008) Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J Gastroenterol.* 14(4): p. 524-31.
 182. Wei X, Wang G, Li W, Hu X, Huang Q, Xu K, Lou W, Wu J, Liang C, Lou Q, Qian C, and Liu L. (2014) Activation of the JAK-STAT3 pathway is associated with the growth of colorectal carcinoma cells. *Oncol Rep.* 31(1): p. 335-41.
 183. Igci M, Cakmak EA, Oztuzcu S, Bayram A, Arslan A, Gogebakan B, Igci YZ, Cengiz B, Ozkara E, Camci C, and Demiryurek AT. (2012) Mutational screening of the SOCS3 gene promoter in metastatic colorectal cancer patients. *Genet Test Mol Biomarkers.* 16(12): p. 1395-400.
 184. Tokita T, Maesawa C, Kimura T, Kotani K, Takahashi K, Akasaka T, and Masuda T. (2007) Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas. *Int J Oncol.* 30(3): p. 689-94.
 185. Feng Y, Wang Z, Bao Z, Yan W, You G, Wang Y, Hu H, Zhang W, Zhang Q, and Jiang T. (2014) SOCS3 Promoter Hypermethylation Is a Favorable Prognosticator and a Novel Indicator for G-CIMP-Positive GBM Patients. *PLoS One.* 9(3): p. e91829.
 186. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, Xia B, Kuipers EJ, and van der Woude CJ. (2010) Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut.* 59(2): p. 227-35.
 187. Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de Haar C, and van der Woude CJ. (2012) IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 33(10): p. 1889-96.
 188. Whitcomb BP, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, and Goodfellow PJ. (2003) Frequent HOXA11 and THBS2 promoter methylation, and a methylator phenotype in endometrial adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 9(6): p. 2277-87.
 189. Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Tamaoki N, and Ueyama Y.

- (1999) Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer*. 79(2): p. 354-9.
190. Stone A, Cowley MJ, Valdes-Mora F, McCloy RA, Sergio CM, Gallego-Ortega D, Caldon CE, Ormandy CJ, Biankin AV, Gee JM, Nicholson RI, Print CG, Clark SJ, and Musgrove EA. (2013) BCL-2 hypermethylation is a potential biomarker of sensitivity to antimetabolic chemotherapy in endocrine-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 12(9): p. 1874-85.
 191. Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalzo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, and Liang G. (2004) Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res*. 10(22): p. 7457-65.
 192. Torsello A, Garufi C, Cosimelli M, Diodoro MG, Zeuli M, Vanni B, Campanella C, D'Angelo C, Sperduti I, Perrone Donnorso R, Cognetti F, Terzoli E, Mottolise M, and Colorectal Disease Management Team RECIRI. (2008) P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance. *Eur J Cancer*. 44(9): p. 1217-22.
 193. Biden KG, Simms LA, Cummings M, Buttenshaw R, Schoch E, Searle J, Gobe G, Jass JR, Meltzer SJ, Leggett BA, and Young J. (1999) Expression of Bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Oncogene*. 18(5): p. 1245-9.
 194. Babidge WJ, Butler LM, Burton MA, and Cowled PA. (2001) Methylation of CpG sites in exon 2 of the bcl-2 gene occurs in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 21(4A): p. 2809-14.
 195. Xie HQ, Liang D, Leung KW, Chen VP, Zhu KY, Chan WK, Choi RC, Massoulié J, and Tsim KW. (2010) Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons. *J Biol Chem*. 285(15): p. 11537-46.
 196. Sabunciyan S, Aryee MJ, Irizarry RA, Rongione M, Webster MJ, Kaufman WE, Murakami P, Lessard A, Yolken RH, Feinberg AP, Potash JB, and Gen REDC. (2012) Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder. *PLoS One*. 7(4): p. e34451.
 197. Spisak S, Kalmar A, Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Peterfia B, Csabai I, Kovalszky I, Semsey S, Tulassay Z, and Molnar B. (2012) Genome-wide screening of genes regulated by DNA methylation in colon cancer development. *PLoS One*. 7(10): p. e46215.
 198. Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild PJ, Veeck J, Knuchel R, Klopocki E, Sauter G, Simon R, Wieland WF, Walter B, Denzinger S, Hartmann A, and Hammerschmied CG. (2007) Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 26(38): p. 5680-91.
 199. Valcz G, Patai AV, Kalmar A, Peterfia B, Furi I, Wichmann B, Muzes G, Sipos F, Krenacs T, Mihaly E, Spisak S, Molnar B, and Tulassay Z. (2014) Myofibroblast-derived SFRP1 as potential inhibitor of colorectal carcinoma field effect. *PLoS One*. 9(11): p. e106143.
 200. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, and Vyzula R. (2007) Altered expression of miR-21, miR-31, miR-

- 143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 72(5-6): p. 397-402.
201. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, and Mo YY. (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26(19): p. 2799-803.
 202. Ouyang YB, Lu Y, Yue S, and Giffard RG. (2012) miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *Mitochondrion*. 12(2): p. 213-9.
 203. Toth K, Galamb O, Spisak S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnar B, and Tulassay Z. (2011) The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*. 17(3): p. 503-9.
 204. Peddareddigari VG, Wang D, and Dubois RN. (2010) The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron*. 3(1): p. 149-66.
 205. Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, Numata Y, and Okayasu T. (2006) Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut*. 55(5): p. 695-702.
 206. Sheehan KM, Gulmann C, Eichler GS, Weinstein JN, Barrett HL, Kay EW, Conroy RM, Liotta LA, and Petricoin EF, 3rd. (2008) Signal pathway profiling of epithelial and stromal compartments of colonic carcinoma reveals epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 27(3): p. 323-31.
 207. Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Fraga MF, Vilorio CG, Capella G, Gausachs M, Esteller M, Lopez-Otin C, and Cal S. (2009) The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer. *J Cell Sci*. 122(Pt 16): p. 2906-13.
 208. Bosman FT, de Bruine A, Flohil C, van der Wurff A, ten Kate J, and Dinjens WW. (1993) Epithelial-stromal interactions in colon cancer. *Int J Dev Biol*. 37(1): p. 203-11.
 209. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, Tangrea MA, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR, Tangrea JA, Libutti SK, Linehan WM, and Woodson KG. (2006) Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells. *J Natl Cancer Inst*. 98(4): p. 255-61.
 210. Estey MP, Di Ciano-Oliveira C, Froese CD, Bejide MT, and Trimble WS. (2010) Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *J Cell Biol*. 191(4): p. 741-9.
 211. Shankar J, Messenberg A, Chan J, Underhill TM, Foster LJ, and Nabi IR. (2010) Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *Cancer Res*. 70(9): p. 3780-90.
 212. Hackenberg M, Barturen G, and Oliver JL. (2011) NGSmethDB: a database for next-generation sequencing single-cytosine-resolution DNA methylation data. *Nucleic Acids Res*. 39(Database issue): p. D75-9.
 213. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, and James SJ. (2001) Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr*. 131(11): p. 2811-8.

214. Qin LF, Ng IO, Fan ST, and Ng M. (1998) p21/WAF1, p53 and PCNA expression and p53 mutation status in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 79(4): p. 424-8.
215. Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, and Baylin SB. (1993) Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst*. 85(15): p. 1235-40.
216. Steine EJ, Ehrich M, Bell GW, Raj A, Reddy S, van Oudenaarden A, Jaenisch R, and Linhart HG. (2011) Genes methylated by DNA methyltransferase 3b are similar in mouse intestine and human colon cancer. *J Clin Invest*. 121(5): p. 1748-52.
217. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, and Baylin SB. (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*. 39(2): p. 237-42.
218. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, and Cedar H. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 39(2): p. 232-6.
219. Xie H, Wang M, de Andrade A, Bonaldo Mde F, Galat V, Arndt K, Rajaram V, Goldman S, Tomita T, and Soares MB. (2011) Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res*. 39(10): p. 4099-108.
220. Dickson J, Gowher H, Strogantsev R, Gaszner M, Hair A, Felsenfeld G, and West AG. (2010) VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation. *PLoS Genet*. 6(1): p. e1000804.
221. Frigola J, Song J, Storzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, and Clark SJ. (2006) Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*. 38(5): p. 540-9.
222. Berdasco M and Esteller M. (2010) Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 19(5): p. 698-711.
223. Noreen F, Roosli M, Gaj P, Pietrzak J, Weis S, Urfer P, Regula J, Schar P, and Truninger K. (2014) Modulation of age- and cancer-associated DNA methylation change in the healthy colon by aspirin and lifestyle. *J Natl Cancer Inst*. 106(7).
224. Valinluck V, Liu P, Kang JI, Jr., Burdzy A, and Sowers LC. (2005) 5-halogenated pyrimidine lesions within a CpG sequence context mimic 5-methylcytosine by enhancing the binding of the methyl-CpG-binding domain of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*. 33(9): p. 3057-64.
225. Huang J, Wang Y, Guo Y, and Sun S. (2010) Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*. 52(1): p. 60-70.
226. Saito Y and Jones PA. (2006) Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 5(19): p. 2220-2.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 A disszertáció témájában megjelent közlemények

11.1.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Kalmár A., Péterfia B., Hollósi P., Galamb O., Spisák S., Wichmann B., Bodor A., Tóth K., Patai V. Á., Valcz G., Nagy Zs. B., Kubák V., Tulassay Zs., Kovalszky I., Molnár B. - DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 colorectal adenoma and cancer. (2015) BMC Cancer, (2015) 15:736. doi:10.1186/s12885-015-1687-x **IF: 3,362**

Kalmár A., Wichmann B., Galamb O., Spisák S., Tóth K., Leiszter K., Schnack N. B., Barták B. K., Tulassay Zs., Molnár B. - Gene-expression analysis of a colorectal cancer-specific discriminatory transcript set on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. (2015) Diagnostic Pathology, 10: (1) paper 126. 12 p. doi:10.1186/s13000-015-0363-4 **IF: 2,597**

Kalmár A., Péterfia B., Wichmann B., Patai V. Á., Barták Barbara K., Nagy Zsófia B., Fúri I., Tulassay Zs., Béla Molnár – Comparison of automated and manual DNA isolation methods for DNA methylation analysis of biopsy, fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. (2015) Journal of Laboratory Automation, 1-10. doi:10.1177/2211068214565903 **IF: 1,879**

Kalmár A.; Péterfia B., Hollósi P., Wichmann B., Bodor A., Patai V. Á., Krenács T., Tulassay Zs., Molnár B. - Bisulfite-based DNA methylation analysis from recent and archived formalin-fixed, paraffin embedded colorectal tissue samples. (2015) Pathology and Oncology Research, May 2015: Paper doi:10.1007/s12253-015-9945-4. **IF: 1,855**

Wasserkort R., **Kalmar A.**, Valcz G., Spisak S., Krispin M., Toth K., Tulassay Z., Sledziewski A.Z., Molnar B. - (2013) Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. (2013). BMC Cancer. 2013;13(1):398. doi:10.1186/1471-2407-13-398 **IF: 3,319**

Spisák S., **Kalmár A.***, Galamb O., Wichmann B., Sipos F., Péterfia B., Csabai I., Kovalszky I., Semsey S., Tulassay Z., Molnár B. - Genome-Wide Screening of Genes Regulated by DNA Methylation in Colon Cancer Development. (2012) PLoS ONE, 7(10): e46215. doi:10.1371/journal.pone.0046215 **IF: 3,730**

Tóth K., Wasserkort R., Sipos F. **Kalmár A.**, Wichmann B., Leiszter K., Valcz G., Juhász M., Miheller P., Patai V. Á., Tulassay Zs., Molnár B. - Detection of methylated Septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. (2014) PloS One 9 (12), e115415 **IF: 3,234**

Galamb O., Wichmann B., Sipos F., Spisák S., Krenács T., Tóth K., Leiszter K., **Kalmár A.**, Tulassay Z., Molnár B. - Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. (2012) PLoS ONE 7(11): e48547. doi:10.1371/journal.pone.0048547 **IF: 3,730**

Patai Á.V., Molnár B., **Kalmár A.**, Schöller A., Tóth K., Tulassay Z. - Role of DNA Methylation in Colorectal Carcinogenesis. (2012) Dig Dis 2012;30:310-315 (DOI: 10.1159/000337004) **IF: 2,725**

Tóth K., Sipos F., **Kalmár A.**, Patai A.V., 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. (2012) PLoS One. 2012;7(9):e46000. doi: 10.1371/journal.pone.0046000. **IF: 3,730**

Patai Á.V., Valcz G., Hollósi P., **Kalmár A.**, Péterfia B., Patai Á., Wichmann B., Spisák S., Barták B. K., 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. (2015) PLoS One. 2015;10:e0133836.**IF: 3,234**

11.1.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények

Spisak S., **Kalmar A.**, Molnár B., Sipos F., Wichmann B., Galamb O., Tulassay Zs. - Metilációs szabályozás alatt álló gének azonosítása lézerrel kimetszett vastagbél-daganat-sejtekben az adenoma-carcinoma sorrend vizsgálata során. (2010) Orvosi Hetilap 151:(20) pp. 805-814. **IF: 0**

11.2. A disszertáció témájától eltérő témában megjelent közlemények

11.2.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Fűri I., Sipos F., Germann T. M., **Kalmár A.**, Tulassay Zs., Molnár B., Múzes Gy. - Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: Clinico-pathogenic aspects. (2013) *World J Gastroenterol.* 2013 July 14; 19(26): 4119–4126 doi: 10.3748/wjg.v19.i26.4119 **IF: 2,433**

Leiszter K., Galamb O., Sipos F., Krenacs T., Veres G., Wichmann B., **Kalmár A.**, Patai A. V., Toth K., Valcz G., Molnar B., Tulassay Zs. - Sporadic Colorectal Cancer Development Shows Rejuvenescence Regarding Epithelial Proliferation and Apoptosis. (2013) *PLoS ONE* 8(10): e74140. doi:10.1371/journal.pone.0074140 **IF: 3,534**

Valcz G., Patai V.Á., **Kalmár A.**, Péterfia B., Fűri I., Wichmann B., Múzes Gy., Sipos F., Krenács T., Mihály E., Spisák S., Molnár B., Tulassay Zs. - Myofibroblast-Derived SFRP1 as Potential Inhibitor of Colorectal Carcinoma Field Effect *PloS one* 9 (11), e106143 **IF: 3,234**

Leiszter K., Sipos F., Galamb O., Krenács T., Veres G., Wichmann B., Fűri I., **Kalmár A.**, Patai AV., Tóth K., Valcz G., Tulassay Z., Molnár B. - Promoter Hypermethylation-Related Reduced Somatostatin Production Promotes Uncontrolled Cell Proliferation in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 10:(2) p. e0118332. (2015) **IF: 3,234**

11.2.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények

Valcz G., Patai Á. V., **Kalmár A.**, Sipos F., Molnár B., Tulassay Zs. - A horizontális génátvitel szerepe a tumorképződésben. *Magyar Belorvosi Archivum* 65:(4) pp. 256-260. (2012) **IF: 0**

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik PhD munkám elkészítésében segítségemre voltak:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, és a II. sz. Belgyógyászati Klinika Igazgatójának, Prof. Dr. Rácz Károly egyetemi tanárnak, hogy támogatták munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy PhD éveim alatt egy korszerűen felszerelt laboratóriumban dolgozhattam, irányítása alatt a tudományos kutatópályámon elindulhattam és rengeteg tapasztalatot szerezhettem;
- Dr. Szücs Nikolette és Dr. Werling Klára házi opponenseimnek;
- Dr. Spisák Sándornak, aki első mentoromként bevezetett a molekuláris biológia gyakorlati világába és akitől elsajátíthattam a megfelelő kutatói szemléletmódot;
- Dr. Galamb Orsolyának, akinek szakmai tanácsaira mindig számíthattam;
- Dr. Valcz Gábornak, Dr. Krenács Tibornak és Dr. Sipos Ferencnek a szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
- Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért;
- Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Hollósi Péternek, Kovalszky Ilona Professzorasszonynak, Kubák Viviennek, Dr. Kiss Katalinnak, Horváth Zsoltnak és Dr. Baghy Kornéliának, akik nélkül a DNS metilációs vizsgálatok nem valósulhattak volna meg
- Kónyáné Farkas Gabriella és Tóth Bernadett asszisztenseknek;
- Dr. Paku Sándornak, Bugyik Edinának és Dezső Katalinnak, hogy az I. sz. Kísérleti Rákkutató Intézet Májpatológia Laboratóriumában fagyasztott metszeteket elkészíthettem
- a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópiájának személyzete részére, akik nélkül a klinikai minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg;
- Dr. Tóth Kingának, Dr. Leiszter Katalinnak, Dr. Patai Árpádnak, Barták Barbara Kingának, Nagy Zsófia Brigittának, Dr. Schöller Andreának és Fűri Istvánnak laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért és barátságukért;
- Berczik Máriaának minden adminisztratív feladat megoldásában nyújtott segítségéért;
- Családomnak és barátaimnak PhD munkám során nyújtott biztatásukért.