

A vastagbél-daganat kialakulásának in situ és perifériás vér biomarkerei

Doktori értekezés

Dr. Tóth Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Hivatalos bírálók: Dr. Dank Magdolna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika, Ph.D., megbízott osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szaleczky Erika, Ph.D., adjunktus
Dr. Péter Antal, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A vastagbélrák jelentősége	6
1.1.1. Epidemiológia.....	6
1.1.2. Stádiumbeosztás	6
1.1.3. Prognózis	8
1.1.4. Vastagbél daganatok diagnosztikai és szűrőmódszerei	8
1.1.4.1 A gFOBТ (guajak-alapú occult székletvér vizsgálat) szűrőmódszer	10
1.1.4.2 A FIT vagy iFOBТ (immunkémiai occult székletvér vizsgálat) alapú szűrés	11
1.1.4.3 Széklet DNS teszt a vastagbél daganatok szűrésére	12
1.1.4.4. Flexibilis sigmoidoscopya szűrőmódszer.....	12
1.1.4.5. Kettős kontrasztos irrigoscopia	13
1.1.4.6. Virtuális colonoscopya: CT vagy MR colonography	13
1.1.4.7. PET-CT.....	14
1.1.4.8. Colonoscopya mint az alapvető diagnosztikai és szűrési módszer	14
1.1.4.9. Vér alapú és egyéb non-invazív eljárások és fejlesztések a vastagbél daganatok korai kimutatására	15
1.1.5. A vastagbél daganatok genetikai alapjai és a molekuláris osztályozása	16
1.1.5.1. Kromoszómális instabilitás (CIN)	17
1.1.5.2. Mikroszatellita instabilitás (MSI).....	19
1.1.5.3. CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP)	20
1.2. DNS metiláció	23
1.3. Cirkuláló szabad DNS (cfDNS) eredete és alkalmazási lehetősége a szűrésben	26
1.4. A Septin géncsalád	28
1.4.1. Septinek összefüggése különböző betegségekkel	30
1.4.2. SEPT9 és a vastagbélrák	32
2. CÉLKITŰZÉSEK	34
3. MÓDSZEREK	35
3.1. Minták és betegek.....	35
3.2. A SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata vérplazma és szöveti mintákon	36
3.2.1. Mintagyűjtés	36
3.2.2. DNS izolálás és biszulfid konverzió	37
3.2.3. Kvantitatív RT-PCR	39
3.2.4. Statisztikai elemzés	40
3.3. A SEPT9 gén hipermetilációjának hatása az mRNS expresszióra.....	41
3.3.1. Mintagyűjtés a microarray vizsgálatokhoz.....	41
3.3.2. Nukleinsav izolálás, minőségi és mennyiségi ellenőrzés	41
3.3.3. Microarray vizsgálat	41
3.3.4. Statisztikai kiértékelés	44

3.4. A SEPT9 gén metiláció hatása a fehérje expresszióra	44
3.4.1. Mintagyűjtés	44
3.4.2. Immunhisztokémia	45
3.4.3. Statisztikai elemzés	46
3.5. SEPT9 gén és splice variánsainak expressziós vizsgálata lézer mikrodisszekált mintákban	46
3.5.1. Mintagyűjtés, RNS izolálás	46
3.5.2. Lézer mikrodisszekció (LCM)	46
3.5.3. Nukleinsav izolálás.....	47
3.5.4. Microarray vizsgálat.....	47
3.5.5. Valós-idejű PCR.....	47
3.5.6. Statisztikai elemzés	48
3.6. Cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata	49
3.6.1. Mintagyűjtés	49
3.6.2. DNS izolálás, kvantitatív PCR	49
3.6.3. Statisztikai analízis	49
3.7. A metilált SEPT9 marker szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén.....	49
3.7.1. Mintagyűjtés	49
3.7.2. DNS izolálás, biszulfid konverzió, kvantitatív PCR	50
3.7.3. Statisztikai kiértékelés	50
3.8. A metilált SEPT9 marker hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel	51
3.8.1. Mintagyűjtés	51
3.8.2. Statisztikai kiértékelés	51
4. EREDMÉNYEK	52
4.1. SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata vérplazma és szövettani mintákon	52
4.2. A SEPT9 gén hipermetilációjának hatása az mRNS expresszióra.....	55
4.3. A SEPT9 gén metiláció hatása a fehérje expresszióra	56
4.4. A SEPT9 mRNS expresszió vizsgálata lézer mikrodisszekált mintákon.....	57
4.4.1. SEPT9 mRNS expresszió vizsgálat microarray-en	57
4.4.2. SEPT9 mRNS splice variánsok expressziójának elemzése	57
4.5. A cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata	58
4.6. A mSEPT9 marker szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén.....	60
4.7. A mSEPT9 marker hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel	64

5. MEGBESZÉLÉS	65
5.1. A septinek szerepe a különböző sejtfolyamatokban és a tumorigenezisben	65
5.2. A SEPT9 gén metilációjának vizsgálata a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során	67
5.3. A SEPT9 gén metilációjának hatása az mRNS és fehérje szintre	68
5.4. A SEPT9 splice variánsok vizsgálata	70
5.5. A SEPT9 metiláció és a szabad DNS szint közti összefüggés	73
5.6. A SEPT9 gén mint CRC biomarker	74
5.7. A mSEPT9 kimutatási módszer hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel	79
5.8. Legfontosabb új megállapítások és megfigyelések	81
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	82
7. ÖSSZEFOGLALÁS	83
7.1. Összefoglalás - magyar.....	83
7.2. Összefoglalás - angol.....	84
8. IRODALOMJEGYZÉK	85
9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	103
9.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények	103
9.2. Disszertációtól független közlemények.....	103
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	107

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACF = aberráns kripta fókusz (aberrant crypt foci)

ACS = adenoma-carcinoma szekvencia

ACTB = β -aktin háztartási gén

BMI = body mass index

BSA = szarvasmarha szérumalbumin (bovine serum albumin)

Cdc = sejtosztódási ciklus (cell division cycle)

CEA = carcino-embionális antigén

cfDNS = circuláló szabad DNS (circulating free DNA)

CIMP = CpG sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype)

CIN = kromoszómális instabilitás

CpG = citozin-foszfo-guanin dinukleotid

CRC = vastagbélrák (colorectal cancer)

CT = detektálási határ (cycle threshold)

CTC = virtuális colonoscopia (CT colonography)

DCC = deleted in colorectal cancer

DNMT = DNS-metiltranszferáz

DNS = dezoxiribonukleinsav

ER = ösztrogén-receptor (estrogen receptor)

FAP = familiáris adenomatosus polyposis

FIT = immunkémiai széklet occult vérvizsgálat (fecal immunochemical test)

GCRMA = GeneChip Robust Multiarray Averaging

GSK-3 β = glikogén szintáz kináz 3 β

gFOBT = guajak-alapú széklet occult vérvizsgálat (fecal occult blood test)

HLTF = helikáz-szerű transzkripció faktor (helicase-like transcription factor)

HPP1 = hyperplastic polyposis 1 gén

LCM = lézer-mikrodisszekció (laser capture microdissection)

LOH = heterozigotitás elvesztése (loss of heterozygosity)

MLL = myeloid/lymphoid vagy mixed linkage leukemia gén

mSEPT9 = metilált Septin 9

MSI = mikroszatellita instabilitás

MSI-H = magas szintű mikroszatellita instabilitás

MSI-L = alacsony szintű mikroszatellita instabilitás
MSS = mikroszatellita stabilitás
MMR = DNS hibajavító (mismatch repair) rendszer
NAT = szövettanilag egészséges szövet a tumor mellett
NGFR = idegi növekedési faktor receptor (nerve growth factor receptor)
O-6-MGMT = O-6- metilguanin-DNS-metiltranszferáz
PET = pozitronemissziós tomográfia
PCDH10 = protokadherin 10
PCR = polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PRESEPT = Prospective Evaluation of Septin 9 Performance for Colorectal Cancer Screening
PMR = metilációs szint százalékos értéke (percent of methylated reference)
RIA = radioimmunassay
RIN = RNS integritási szám
RT-PCR = valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)
RUNX3 = runtszerű transzkripció faktor 3 (runt-related transcription factor 3)
SAM = Significance Analysis of Microarray
SEPT9 = Septin 9
SFRP5 = szekretált frizzled-rokon fehérje 5 (secreted frizzled-related protein 5)
TCF = T sejt faktor (T cell factor)
TGF- β = transzformáló növekedési faktor- β
TMEFF = transzmembrán fehérje EGF-szerű és két follisztatin-szerű doménnel (transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains)
UICC = Nemzetközi Rákellenes Szövetség (Union for International Cancer Control)

1. BEVEZETÉS

1.1. A vastagbélrák jelentősége

1.1.1. Epidemiológia

A vastag- és végbéldaganatok előfordulása és gyakorisága világszerte növekszik. Napjainkban a harmadik leggyakoribb daganattípus, férfiaknál a prosztatata- és tüdőtumороkat, nőknél az emlő- és tüődaganatokat követve. Becslések szerint, 2008-ban 1,24 millió újonnan diagnosztizált esettel az összes tumoros betegség incidenciájának 10%-át adták [1].

Az európai lakosságban a 2012-es évben 3,45 millió újonnan diagnosztizált daganatot és 1,75 millió daganat okozta halálozást becsültek. Ebből az emlőtumort követve, a második leggyakoribb daganattípus a vastagbéldaganat volt, 447 000 esettel. A mortalitás tekintetében is a vastagbél daganatok foglalják el a második helyet (215 000 eset) a tüdőtumороk után [2].

A vastagbél eredetű tumorok megjelenésében földrajzi különbségek figyelhetők meg. A betegség több, mint 63%-a a nyugati kultúrával rendelkező fejlett országokban fordul elő. Az Amerikai Egyesült Államokban, Ausztráliában, Új-Zélandon és Európa nyugati részén 100 000 emberből több, mint 40-nél figyelhető meg, míg Afrikában és Ázsia bizonyos részein ez a szám kevesebb, mint öt [3]. A vastagbél tumorok incidenciájának emelkedését figyelték meg a közép-európai országokban is, így hazánkban 100 000 emberből 87-re becsülték 2012-ben [2].

Etnikai vizsgálatok során megfigyelték, hogy a betegség kialakulásában igen nagy szerepet játszanak a környezeti tényezők, mivel azokban a keleti bevándorlóknak is megnőtt a betegség incidenciája, akik nyugati országokba emigráltak [4].

1.1.2. Stádiumbeosztás

A betegség prognózisát a daganat stádiuma határozza meg. A stádiumbeosztásra többféle módszert dolgoztak ki: a TNM-rendszert, Dukes-féle (Astler-Coller szerint módosítva) beosztást vagy a Nemzetközi Rákellenes Szövetség (Union for International Cancer Control - UICC) klasszifikációs rendszerét (1. táblázat). A TNM beosztás során nemcsak a tumor méretét, az invazivitást, a daganat kiterjedését, hanem a környező,

távoli nyirokcsomók érintettséget és a szervei áttétek jelenlétét is figyelembe veszik [5, 6]. A klinikai gyakorlatban a könnyebben alkalmazható Dukés-féle stádiumbeosztás használata terjedt el.

1. táblázat: Vastagbél daganatok stádiumbeosztása

Dukes* [5]	UICC [6]	TNM 7 th [5, 6]	Kórbonctani jellemző [5, 6]
-	0	$T_{is} N_0 M_0$	T_{is} : carcinoma in situ: intraepitheliális érintettség N_0 : nincs ismert regionális nyirokcsomó metasztázis M_0 : nincs ismert távoli metasztázis
A	I	$T_1 N_0 M_0$	T_1 : tumor betör a submucosába
B1		$T_2 N_0 M_0$	T_2 : tumor infiltrálja a muscularis propriát
B2	IIA	$T_3 N_0 M_0$ $T_{4a} N_0 M_0$	T_3 : tumor betör a subserosába vagy a nem peritoneális vastagbél körüli területekre
	IIB		T_{4a} : tumor penetrál a viscerális peritoneum felszínére
B3	IIC	$T_{4b} N_0 M_0$	T_{4b} : tumor közvetlenül a szomszédos szervekbe, struktúrákba tör
C1	IIIA	$T_{1-2} N_{1a/1b/1c} M_0$ $T_1 N_{2a} M_0$ $T_{1-2} N_{2b} M_0$ $T_{2-3} N_{2a} M_0$	regionális nyirokcsomó áttétek: N_{1a} : 1 regionális nyirokcsomó érintett, N_{1b} : 2-3 regionális nyirokcsomó érintett, N_{1c} : tumor depozit(ok) a subserosában, mesentériumban vagy a peritoneummal nem fedett pericolicus vagy perirectalis szövetekben regionális nyirokcsomó metasztázisok nélkül
	C2	IIB	
C3		IIC	
	D	IVA	
IVB		$T_{x,0, is, 1-4} N_{x, 0, 1-2} M_{1b}$	M_{1b} : távoli metasztázis egynél több szervben vagy a peritoneumon

*: Astler-Coller szerint módosítva

1.1.3. Prognózis

A vastagbél daganatok túlélési statisztikái az elmúlt években kedvező tendenciákat mutatnak a korai diagnózisoknak és a továbbfejlesztett kezeléseknek köszönhetően. Az európai országokban az 5 éves túlélés átlagosan 60% alatt van. A tünetmentes stádiumban felismert daganatok túlélési esélyei kedvezőek: Dukes A stádiumban 90%, Dukes B1 esetén 70% és Dukes B2 stádium esetében 50%. Klinika tüneteket általában a késői stádiumú tumorok okoznak, amelyek 5 éves túlélési kilátásai is rosszabbak: Dukes C1 esetén 40%, Dukes C2 stádiumnál 25%, míg Dukes D esetén 0% [7]. Egy másik tanulmányban a legmagasabb értéket, 97,1%-ot az UICC szerinti I. stádiumban írták le, míg a legalacsonyabbat, 27,1%-ot a IIIC (T4, N2) stádiumban figyelték meg. A II. stádiumban 71,5-87,5%-os túlélést említ az irodalom, míg a III stádium többi alcsoportjában (IIIA-IIIC /T4, N1/) 50,5-87,5%-os a túlélés valószínűsége [8].

1.1.4. Vastagbél daganatok diagnosztikai és szűrő módszerei

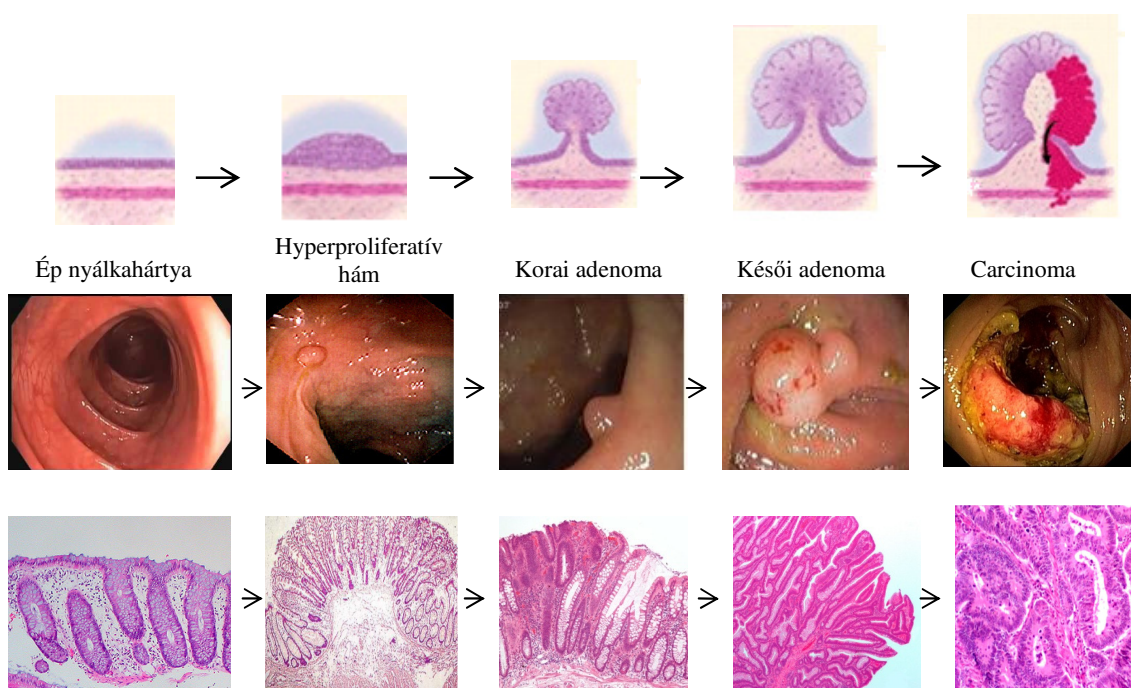
A vastagbél daganatos betegek túlélését a korai diagnosztika (felismerés) javíthatja. A diagnózis mihamarabbi felállítása azonban sok esetben nehéz a jellegzetes vagy specifikus tünetek hiánya (pl.: széklethabitus változás, véres széklet, hasi fájdalom vagy fogyás) miatt [9]. Ezért a szűrő módszerek célja a daganat kimutatása minél korábbi stádiumban, esetleg már a daganatot megelőző állapot észlelése.

A szűrő módszerek általános kritériumai a következők: 1. fontos egészségügyi problémát szűrjön; 2. a betegség gyógyítható legyen; 3. korai, még tünetmentes állapotban is kimutatható legyen, 4. a megfelelő szűrő módszernek elérhetőnek kell lennie; 5. a betegség természete ismert legyen és a bizonyítékon alapuló terápia széles körben alkalmazható legyen [9]. A szűrő módszernek fajlagosnak, érzékenynek, olcsónak, egyszerűnek, könnyen kivitelezhetőnek, biztonságosnak és a társadalom által elfogadottnak kell lennie [10].

A teljes populáció szűrése, a korai rákmegelőző állapotok endoszkópos vagy sebészi ellátása csökkentheti a mortalitást. A vastagbél daganatok túlélési aránya az utóbbi néhány évben javult a viszonylag korai felismerésnek és a folyamatosan megújuló, továbbfejlesztett kezeléseknek köszönhetően.

A vastagbél daganatok szűrésének célja az, hogy a daganatokat korai stádiumban észleljük, esetleg a daganatokat megelőző adenoma stádiumot kimutassa, így megelőzze az előrehaladott stádiumok kialakulását.

A vastagbél adenomák szűrésének fontosságát igazolja, hogy a daganatok 95%-a belőlük fejlődik ki. Az 50 éve feletti népesség kb. 1/3-ban igazolható adenoma, amelyek 5%-ból alakul ki tumor. Ez a kockázat az ún. "rizikópolypok" esetén még magasabb. Ebbe a kategóriába tartoznak az egy cm-nél nagyobb polypok, a villosus adenomák vagy a legalább 20% villosus komponenssel rendelkező tubulovillosus adenomák, a többszörös (>3) és a súlyos dysplasiát mutató adenomák [10, 11] (1. ábra).



1. ábra. A vastagbél daganat kialakulásának egyik lehetséges modellje

A felső ábrásor forrása: [11- módosítva]

A vastagbél daganatok szűrésére manapság számos módszer használható, melyek két nagy kategóriába sorolhatók: 1) széklet tesztek vagy nem invazív tesztek (gFOBT - guajak-alapú occult székletvér teszt, FIT vagy iFOBT- immunkémiai székletvér teszt és széklet DNS teszt) és 2) eszközös vizsgálatok vagy invazív tesztek (flexibilis sigmoidoscopia, kettős kontrasztos irrigoscopia, CT colonographia - virtuális colonoscopia vagy colonoscopia).

Ezeket a tesztekét akár külön-külön, akár kombinációban használják, a rendszeres szűrést biztosító programok a legmegfelelőbb eszközök a vastagbél tumorok okozta mortalitás csökkentésére.

Az Amerikai Rák Egyesület (American Cancer Society) a 80-as évek elejétől javasol irányelveket a vastagbél daganatok szűrésére, amelyek az utóbbi évtizedekben bekövetkezett technológiai fejlődés következtében némileg módosultak [12]. Jelenleg minden 50 év feletti, CRC (colorectal cancer - vastagbélrák) kialakulása szempontjából átlagos rizikójú férfinak és nőnek egyaránt a következő módszerek javasoltak vastagbél polypok és daganatok szűrésére: 5 évente flexibilis sigmoidoscopya vagy 5 évente kettős kontrasztos irrigoscopya vagy 5 évente CT colonographia (virtuális colonoscopya) vagy 10 évente colonoscopya. Természetesen, ha az első három módszer polyp vagy daganat gyanúját veti fel, vastagbéltükrözés elvégzése javasolt [12, 13]. A nem invazív tesztek, mint a gFOBT vagy a FIT, továbbá a széklet DNS vizsgálat pozitivitása esetében is szükséges a colonoscopya elvégzése.

Hazánkban ún. kétlépcsős és egylépcsős szűrési stratégiák ismertek. A kétlépcsős stratégia esetén a székletvér vizsgálat (FOBT) pozitivitást követően flexibilis sigmoidoscopya vagy colonoscopya elvégzése ajánlott, míg az egylépcsős stratégia során már az első lépésben elvégzik az endoszkópos vizsgálatokat [13]. Ennek az egylépcsős eljárásnak az elfogadottsága (compliance-e) a társadalomban alacsony, mivel már az első körben invazív vizsgálatokat alkalmaznak.

Az alkalmazott szűrővizsgálatok ellenére, a két vastagbéltükrözés között megjelenő, ún. intervallum tumorok is ismertek. Ezek a korai stádiumú, inkább a proximális colonfélben előforduló tumorok általában 6-60 hónappal a vastagbéltükrözés után jelennek meg. Egy amerikai tanulmány szerint a betegek 3,5-6%-ban mutathatók ki [14].

1.1.4.1 A gFOBT (guajak-alapú occult székletvér vizsgálat) szűrőmódszer

A székletvér tesztek alkalmazásával csak a nagyobb vérző polypokat vagy a daganatokat tudják kimutatni. A széklettel történő fiziológiás napi vérvesztés 0,5-1,5 ml. Ha a vérvesztés eléri a napi 10 ml-t, a tesztek fele mutat pozitivitást [15].

Tekintettel arra, hogy ez a vérzés gyakran nem folyamatos, hanem intermittáló, az egyszeri vizsgálat nem elegendő, ezért legalább 2-3 alkalommal szükséges székletmintát gyűjteni. A teszt egyik előnye, hogy a gyűjtést a páciens az otthonában is el tudja végezni.

A guajak-alapú teszt a leggyakoribb széklet vizsgálat, amely a hemoglobin vagy hem-pseudoperoxidáz-aktivitását méri. Egyik hátránya, hogy peroxidázokban gazdag ételek (pl: vörös húsok, néhány nyers zöldség) vagy gyógyszerek (NSAID, aspirin) fogyasztását követően álpozitív eredményt kaphatunk. Hamis negatív eredmény C-vitamin alkalmazása során igazolt. Ezért a teszt elvégzése előtt 3-5 napos diéta javasolt [10,12]. Előnyei közé tartozik, hogy olcsó és széles körben elfogadott. Rábdomizált vizsgálatok igazolták, hogy az 50 év feletti korosztályban évente elvégzett gFOBT vizsgálat a vastagbél daganatok mortalitását 16-33%-kal, az incidenciát 17-20%-kal csökkentette [16]. Érzékenysége (szenzitivitása) a nagyobb adenomákra 12%, daganatra 26%, míg fajlagossága (specificitása) 88% és 98% között mozog [17]. Ezek az értékek azonban nagy mértékben függenek az alkalmazott teszt minőségétől, a mintavételi technikából és a minta hidráltságától is [12]. Egy másik tanulmány szerint ugyanis a módszer szenzitivitása adenomákra 41,3%, míg tumorokra 64,3% [18]. A specificitást késői adenomákra és tumorokra is 87,7-98,1% körülinek tapasztalták.

1.1.4.2 A FIT vagy iFOBT (immunkémiai occult székletvér vizsgálat) alapú szűrés

Az előzővel szemben ennek a széklet tesztnek az egyik előnye az, hogy kevesebb minta is elég a vizsgálathoz, a másik, hogy a humán globinnal lép reakcióba, így a nem humán eredetű hemoglobinnal nem reagál, ezért nem kell szigorú diétát tartani a vizsgálat előtt. Azonban fals pozitív eredményeket még ebben az esetben is adhatnak a NSAID szerek, illetve a nem tumor eredetű vérzések, mint az aranyérből származó vérzés [17]. Érzékenysége daganatokra nagyobbak bizonyult, mint a gFOBT-é (81,8%), adenomákra viszont kevésbé szenzitív (29,5%). Fajlagossága számottevően nem változott sem daganatokra (96,9%), sem adenomákra (97,3%) nézve [18]. Más tanulmányok szerint a teszt érzékenysége daganatra 51,8-94,1%, míg fajlagossága 87,5-97,8% volt [19, 20]. További hátránya a guajak módszerrel szemben, hogy költséges, ezért lakossági tömegszűrésekre nem alkalmazzák.

1.1.4.3 Széklet DNS teszt a vastagbél daganatok szűrésére

Ennek a vizsgálatnak az alapja a vastagbél faláról (ép hámról, adenomáról, daganatról) lelokkódó, majd a vastagbél lumenbe kerülő sejtek DNS-ének molekuláris elemzése. Szűrési céllal általában több markert, ún. paneleket szoktak vizsgálni az adenomacarcinoma szekvenciának megfelelően, mint K-ras, BRAF, APC vagy p53 gének mutációit, mikroszatellita instabilitást vagy DNS metilációt. Hátrányai közé tartozik, hogy a többi non-invazív teszthez képest drágább és több mintára van szükség, valamint a minták megfelelő csomagolása és szállítása nagy körültekintést igényel [10]. Az utóbbi időben számos tanulmány született a teszt hatékonyságáról. Az egy metilációs markert (vimentin, SFRP2, TPF12 vagy ITGH4 metiláció) vizsgáló tanulmányokban a teszt érzékenységét vastagbél daganatokra 46%-94%-osnak, késői adenomákra 21-69%-osnak találták, míg fajlagosságát 79-91% közé becsülték. A különböző marker kombinációkat használó vizsgálatokban a módszer szenzitivitása daganatokra 75-91%-os, adenomákra 44-86%-os volt, specificitása pedig elérte a 82-96%-ot [21]. Összehasonlítva az FOBT-vel, a székelt DNS tesztek szignifikánsan nagyobb arányban (52% vs. 13%) mutatják ki a vastagbél daganatot [22]. A székletből K-ras mutációt, NDRG4 és BMP3 metilációt kimutató módszer érzékenysége vastagbél daganatokra és előrehaladott adenomákra is magasabb (92,3%; 42,4%), mint a FIT teszt esetében (48%; 23,8%) [23]. A széklet DNS teszt a daganatot megelőző állapotok kimutatására is alkalmas. Heigh és mtsai az 1 cm-nél nagyobb, sessilis (nyél nélküli), serrated (fogazott mintázatú) polypok kimutatására a székletbeli BMP3 metilációt mint DNS markert találták alkalmasnak ($p < 0,00001$), míg ezen polypok észlelésére a FIT teszt eredménytelen volt [24].

1.1.4.4. Flexibilis sigmoidoscopya szűrő módszer

A rectosigmoideum (kb. 60 cm vastagbél szakasz) átvizsgálására alkalmas módszer előnye, hogy nem igényel szedációt és az előkészítés sem olyan megterhelő a pácienseknek, mint vastagbél tükrözés esetén. Legnagyobb hátránya, hogy csak a proximális vastagbél szakasz átvizsgálására használható, így a disztális colonfélben lévő elváltozások diagnosztizálására alkalmatlan. Ha azonban elváltozások észlelhetők a vizsgált szakaszon, biopszia vétel is történhet a vizsgálat során.

Flexibilis sigmoidoscopiát követő colonoscopiára akkor van szükség, ha ezekben a mintákban adenoma vagy carcinoma igazolódott [12].

A módszer a vastagbél daganatok incidenciáját átlagosan 18%-kal csökkenti [25]. Specificitása 94%-os a daganatokra, de szenzitivitása igen alacsony, ugyanis 28,6-64% között igazolt [26, 27].

1.1.4.5. Kettős kontrasztos irrigoscopia

Az irrigoscopia során röntgensugár segítségével és bárium enema felhasználásával történik a vastagbél elváltozások kimutatása. Hátránya, a sugárterhelés mellett, hogy olyan mértékű előkészítést igényel, mint a vastagbéltükrözés és bármilyen eltérés esetén colonoscopia elvégzése javasolt. Előnye viszont, hogy kisebb megterhelést jelent a páciens számára, mint a vastagbéltükrözés, olcsóbb és biztonságosabb. Érzékenysége az 1 cm-nél kisebb adenomákra 48%-os, a 7 mm-nél nagyobb adenomákra 73%-os és a daganatokra 85-97%-os [12], emiatt gyakran kiesik a mindennapi gyakorlatból.

1.1.4.6. Virtuális colonoscopia: CT vagy MR colonographia

A CTC vagy CT colonographia egy minimálisan invazív, computer tomográfiát (CT) alkalmazó képalkotó eljárás, amivel a colon teljes szakasza átvizsgálható. Hátrányai közé tartozik, hogy teljes előkészítést igényel és mintavételre alkalmatlan, a szervezetet a vizsgálat alatt sugárterhelés éri, valamint a számítógép által rekonstruált kép a nyálkahártya finom részleteit, szerkezetbeli és színbeli eltéréseit nem tudja megjeleníteni. Hátrányai ellenére hazánkban egyre elterjedtebb és széles körben hozzáférhető. Eltérés gyanújakor ebben az esetben is javasolt a vastagbéltükrözés elvégzése. Előnye, hogy ritkán lép fel szövődmény, illetve az extralumináris eltéréseket is kimutatja. Szedálást ritkán igényel és költsége a colonoscopiával összevethető. Leginkább akkor javasolt, ha a beteg általános állapota vagy egyéb eltérések (pl. szűkületek) esetén a vastagbéltükrözés nem kivitelezhető. Ennek következtében a páciensek részvételi aránya magasabb, mint a colonoscopia esetén [10, 12]. Érzékenysége az 1 cm-nél kisebb vastagbél polypokra 70-86%-os, az 1 cm-nél nagyobb adenomákra 85-93%-os és daganatokra 96,1%-os. Specificitása a 6 mm körüli eltérésekre 83,1%-os, és a 10 mm-nél nagyobb eltérésre 94,6%-os [28, 29].

A polypok szűrésére ajánlott protokoll szerint az 5 mm alatti polypokat utánkövetni érdemes, a 10 mm felettek esetén colonoscopia javasolt [10]. Egy 5-9 mm-es polyp észlelésekor 3 évenként ajánlott CTC utánkövetés, míg egyidejűleg több 5-9 mm-es polypus detektálásakor colonoscopia elvégzése ajánlott [10].

Képalkotó vizsgálatok közül az MR colonographia egy újabb lehetséges non-invazív szűrőmódszer vastagbél daganatokra. A CT vizsgálattal szemben előnye, hogy a vizsgálat során nincs sugárterhelés, de a pacemakerrel vagy beültetett fémmel rendelkező páciensek nem vizsgálhatók. Érzékenysége és fajlagossága nem nagyobb, mint a többi módszernek. Érzékenysége 88%-os, specificitása 99%-os az 1 cm-es és az annál nagyobb polypokra, a vastagbél tumorok kimutatására pedig 100%-ban alkalmas [30]. Azonban költségessége és a biopsziavétel hiánya miatt használata lakossági szintű szűrésre nem javasolt [9].

1.1.4.7. PET-CT

Egy másik képalkotó vizsgálat, a PET (pozitronemissziós tomográfia) használata is leginkább a metasztázisok kimutatására használható. Érzékenysége az adenomákra ennek a módszernek sem megfelelő. Egy korábbi tanulmány szerint az adenomák kb. 24%-a mutatható ki PET CT-vel, az érzékenység a polyp méretével párhuzamosan ennél a módszernél is emelkedik [31]. Érzékenysége a daganatokra sem megfelelő, mivel hamis pozitív eredmények születhetnek gyulladással járó állapotok fennállása esetén [32]. Mivel ez a módszer is költséges és mintavételre itt sincs lehetőség, ezért szűrésre nem alkalmazható [9].

1.1.4.8. Colonoscopia mint az alapvető diagnosztikai és szűrési módszer

Ez a módszer a vastagbél daganatok szűrésének "arany standard" eljárása. Előnye, hogy az egész vastagbél áttekinthető, a nyálkahártya közvetlenül vizsgálható, mintavétel lehetséges és terápiás lehetőségek - mint pl. a polypectomia - is rendelkezésre állnak. Azonban ennek a módszernek a használatakor a legmagasabb a szövődmények aránya, valamint teljes előkészítést igényel, ezért a páciensek részvételi aránya alacsony. További hátránya, hogy drága és speciális képzettségű személyzetet igényel. A vastagbél daganatok incidenciáját 76-90%-kal képes csökkenteni.

Számos tanulmány ennél a szűrési módszernél igazolta a legnagyobb érzékenységet és fajlagosságot. Érzékenysége 1 cm-nél kisebb polypokra 75%-os, az 1 cm-nél nagyobb polypokra pedig 90%-os. A daganatokat 95%-os érzékenységgel mutatja ki, specificitása 99-100% körül mozog [10, 33].

1.1.4.9. Vér alapú és egyéb non-invazív eljárások és fejlesztések a vastagbél daganatok korai kimutatására

Ez eddig ismertett konvencionális vér alapú szűrőmódszerek a vastagbél daganatok korai stádiumban való biztos kimutatására alkalmatlanok. A lakosság nyitottabb a nem invazív eljárásokra, ezért újabb lehetséges szűrőmódszerek, terápiát követő utánkövetési módszerek állnak kidolgozás alatt.

Az egyik ilyen lehetséges módszer a tumormarkerek kimutatása. A vastagbél daganatok esetében a carcino-embriális antigén (CEA) és a carcinoma-asszociált karbohidrát antigén (CA 19-9) markereket szokták alkalmazni, amelyek szintje szignifikánsan megemelkedhet tumor esetén. Előnyük, hogy a szérumból kimutathatóak, így minimális invazív beavatkozást jelentek, ezért a lakosság vizsgálatra való hajlandósága esetükben igen magas.

A carcino-embriális antigén egy sejtadhézióban szerepet játszó glikoprotein. Először 1965-ben írták le, mint az első antigént, ami a fetális colonban és a colon adenocarcinómában kimutatható, de az egészséges felnőtt vastagbélben nem [34]. Magas szérum értékét figyelték meg számos jó- és rosszindulatú elváltozásban, mint a vastagbél-, a hasnyálmirigy-, a gyomor-, a tüdő- vagy az emlőtumorokban, valamint pancreatitis vagy colitis ulcerosa esetén [35]. Chen és mtsai vizsgálata szerint érzékenysége a vastagbél daganatra 40,9%-os, specificitása 86,6%-os. Azonban ha egy apoptózisgátló fehérjével, a survivinnel kombinálták a vizsgálatot, kedvezőbb szenzitivitást (51,3%) és specificitást (89,9%) kaptak. [36]. A gyenge érzékenység miatt a teszt alkalmazása csak a betegség utánkövetésére, terápia utáni kiújulás vagy metasztázis kimutatására alkalmazható. A vastagbél daganat kiújulását megközelítőleg 80%-os szenzitivitással és körülbelül 70%-os specificitással tudja kimutatni [37].

A CA 19-9 glikoszfinolipid szenzitivitása CRC-re 26%-os, így tumormarkerként történő használata kevésbé terjedt el vastagbél daganatos betegek körében [38]. Leggyakrabban hasnyálmirigy és epeúti tumorok detektálása használják.

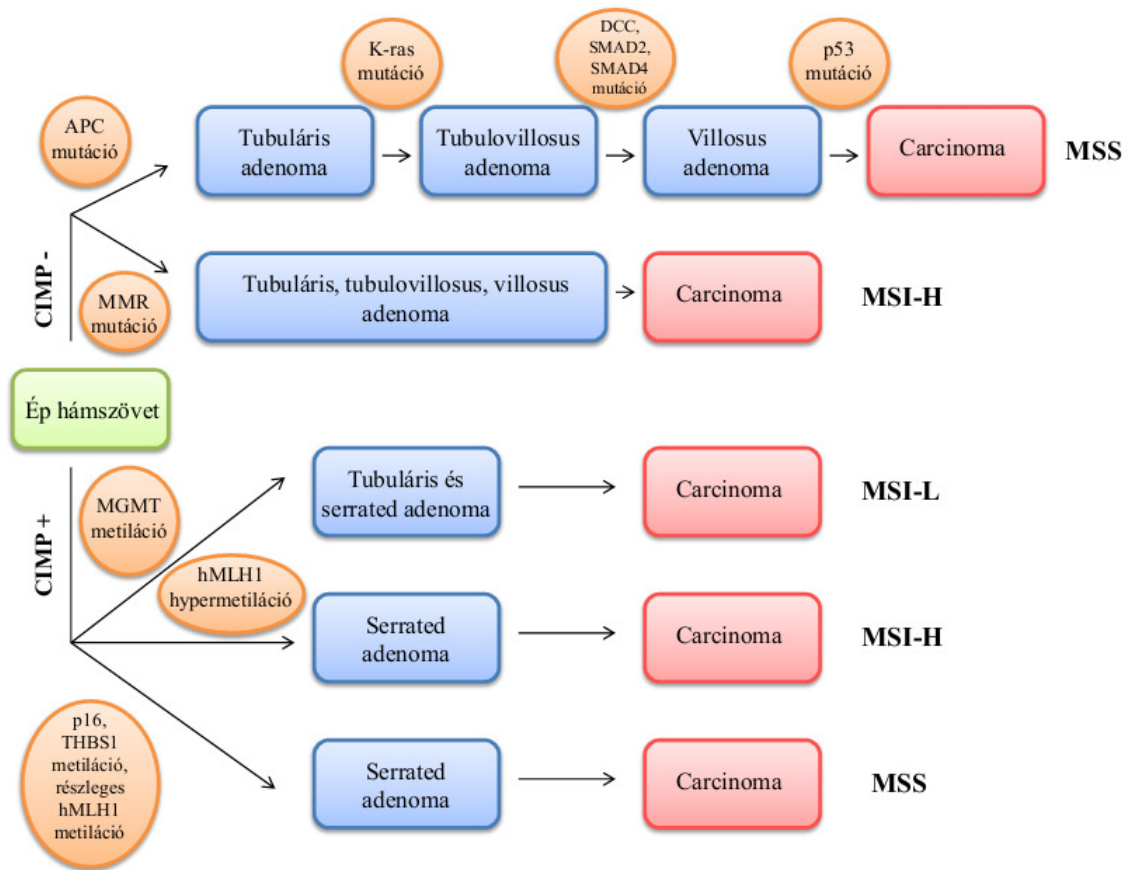
A szérumban tumormarkerek szintjét azonban számos faktor befolyásolhatja, mint pl. a szervezet hidratáltsága vagy a beteg testtömege. Chen és mtsai szerint a szérumban tumormarkerek szintjét befolyásolhatja a páciens testtömeg indexe (BMI - body mass index) is. Megfigyelésük szerint a magas BMI-vel rendelkező egyének alacsony CEA és CA19-9 szintje az emelkedett BMI által okozott hemodilúció következménye [39].

Az utóbbi években egyre inkább terjed a kapszula endoszkópos vizsgálat használata, amely nem igényel invazív beavatkozást, ezért a lakosság hozzáállása pozitív. Azonban ez a módszer is teljes előkészítés igényel, további hátrányai, hogy mintavétel itt nem lehetséges és szövődményként a kapszula retenciója előfordulhat. Lakossági szűrésre a fent említett okok mellett magas költsége is alkalmatlanná teszi [9].

1.1.5. A vastagbél daganatok genetikai alapjai és a molekuláris osztályozása

Vastagbél daganatok kialakulásában számos genetikai és epigenetikai változás és ezek felhalmozódása is szerepet játszik, amelyek az ép vastagbélhám (epitélium) adenocarcinomává való átalakulását eredményezik. Ennek molekuláris biológiai alapját négy központi álláspont teremti meg: 1) a genetikai és epigenetikai változások a sejtek klonális növekedése révén okoznak daganat kialakulást; 2) a daganat képződése molekuláris és morfológiai szinten is egy többlépcsős folyamat eredménye; 3) a tumor létrejöttének egy kulcsfontosságú lépése a genomális instabilitás kialakulása; 4) az öröklődő típusok megjelenése gyakran összefüggést mutat kulcsfontosságú genetikai eltérések csírvonalbeli változataival [40].

A genomális instabilitás három fő molekuláris patológiai úton jöhet létre: a kromoszómális instabilitás (CIN), a mikroszatellita instabilitás (MSI) és a CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP) útvonalakon [41] (2. ábra).



2. ábra: A vastagbél kialakulásának molekuláris háttere

1.1.5.1. Kromoszómális instabilitás (CIN)

A vastagbél tumorok kialakulásának megközelítőleg 70-85%-ért a kromoszómális elváltozások felelősek [41]. A CIN útvonallal legelső elváltozása egy nyálkahártya lézió, a dysplasztikus aberráns kripta góc (aberrant crypt focus = ACF), ami megelőzi a polipok kialakulását. Napjainkban is elfogadott nézet, hogy a vastagbél daganatok a jóindulatú elváltozásokból, az adenomákból is kialakulhatnak. Ezeknek benignus elváltozásoknak a megjelenése legalább 5 évvel előzi meg a rosszindulatú tumorok kialakulását (rákelőző állapot) [42]. Az adenomák megjelenésének földrajzi eloszlása megegyezik a vastagbél daganatok előfordulásának régióival [43].

A Vogelstein-féle adenoma-carcinoma szekvencia (ACS) elmélet szerint a vastagbélrák kialakulása tumor szuppresszor gének inaktivációja és onkogének aktivációja következtében létrejött, többlépcsős folyamat eredménye [44].

Bizonyos kromoszóma régiók elvesztése gyakran vezet a vastagbélben tumoros szövet kialakulásához.

Egészséges szövetben ez az allélvesztés a kromoszómapárnak csak az egyik tagján jelenik meg, ha azonban a kiesett régió kódolja a normális szövetnövekedést szabályozó tumor szuppresszor gént, akkor ez kontrollálatlan szövetnövekedéshez, tumor kialakulásához vezet [45]. Egészséges vastagbél nyálkahártyából, 1 cm-nél kisebb, enyhe dysplasiát mutató, tubuláris adenoma jöhet létre az Adenomatosis Polyposis Coli (APC) tumor szuppresszor gén mutációja következtében [46]. Az APC gén az 5q21 kromoszóma régióban helyezkedik el, amelynek kiesése vagy a gén mutációja a sporadikus vastagbél daganatok 70-80%-ára jellemző, továbbá igen magas százalékban megtalálható az adenomákban is [47]. Csírvonalbeli mutációként az autoszómális dominánsan öröklődő familiáris adenomatosis polyposis (FAP) okozza, amelyre korai felnőttkorban nagyszámú (100-1000) vastagbél adenoma kialakulása jellemző [47]. Az APC gén által kódolt fehérje a Wnt jelátviteli útvonal negatív regulátora, feladata az intracelluláris β -catenin koncentrációjának szabályozása. A nem mutált (vad típusú) APC fehérje komplexet képez a β -catenin és GSK-3 β fehérjékkel, így a β -catenin lebomlását segíti elő. Az APC gén mutációja következtében az APC fehérje nem képes a fehérjekomplex kialakítására, ezért megemelkedik a sejten belüli β -catenin szint. A szabad β -catenin fehérje bejut a sejtmagba, és a T-sejt faktor (TCF) család transzkripciós faktoraihoz kötődve olyan gének transzkripcióját aktiválja, amelyek elősegítik a sejtproliferációt (c-myc, cyclin D1), az érépződést (VEGF), vagy gátolják az apoptózist (MDR1, survivin) [47-52]. Az APC gén tehát számos sejtfolyamat (mint pl. az adhézió, az apoptózis vagy a sejtciklus) szabályozásában részt vesz [51].

Az ACS következő genetikai lépcsőjén a ras családba tartozó K-ras (Kirstein rat sarcoma) onkogén mutációja áll. Az általa kódolt GTPáz aktivitással rendelkező fehérjének a normális sejtproliferációban és differenciációban van alapvető szerepe. Mutációját a vastagbél daganatok és a nagyobb adenomák 40-50%-ában kimutatták, habár a kisebb adenomákban ritkábban fordul elő [52, 53]. Mutációja következtében a kis, enyhén dysplastikus, tubuláris adenomából, 1-2 cm-es, közepesen dysplastikus tubulovillosus adenoma alakul ki [40, 43, 44, 46, 47, 50-53].

A vastagbél karcinogenezis következő lépése a 2 cm-nél nagyobb, súlyosan dysplastikus adenomák kialakulása, amelyek létrejöttében a 18-as kromoszóma hosszú karján található tumor szuppresszor gén, a DCC (deleted in colorectal cancer) vesz részt.

A DCC gén által kódolt fehérjének szerepe van az axon képződésben, az apoptózis indukciójában és a sejtproliferáció negatív szabályozásában [54]. A 18q21 régió elvesztését (heterozigotitás elvesztése = LOH loss of heterozygosity) a vastagbél daganatok 73%-ában, míg az adenomáknak csak 11%-ában mutatták ki. A karcinogenezisben betöltött késői szerepére utalhat, hogy nagyobb százalékban (47%) csak olyan adenomákban észlelték, ahol a mikroinvázió is megfigyelhető volt [49]. Ugyanezen a kromoszóma régió további két tumor szuppresszor gén, a SMAD2 és a SMAD4 is található. Fehérje termékeik a TGF- β receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonal intracelluláris mediátorai. A receptor heterodimerek (TGF- β RI és TGF- β RII) képződése után a SMAD2 és SMAD3 molekulák foszforizálódnak. Ezt követően a SMAD4 fehérjével képeznek heterokomplexet, majd a sejtmagba vándorolva számos sejtfolyamatot (mint pl. a sejtosztódást, a sejt differenciációt, a mátrix termelődést és az apoptózist) befolyásolnak. Mutációjukat vastagbél daganatokban mutatták ki, de adenomákban eddig nem sikerült igazolni [40, 43, 46, 47, 50-52].

A 17-es kromoszóma rövid karján található p53 tumor szuppresszor gén mutációja és inaktivációja felelős a Vogelstein-féle tumorprogressziós modell utolsó szakaszáért, a carcinoma kialakulásáért. Mutációja a humán tumorok kb. 50 %-ában megtalálható [52], invazivitást mutató vastagbél adenomáknak is kb. 50%-ában írták le, míg vastagbél daganatokban 50-75%-os a gyakorisága [47]. Az általa kódolt szekvencia specifikus DNS-kötő fehérje, amely számos gén transzkripcióját szabályozza. Szerepe van a sejtproliferáció gátlásban, a DNS-javítás indukciójában és az apoptózisban [40, 43, 46, 47, 50-52, 55]. A genom őrének is nevezik, mivel DNS károsodás esetén feltartóztatja a sejtciklust a G1 ellenőrzési pontnál, hogy végbemehessen a DNS hibajavítás. Ha ez utóbbi nem következik be, apoptózist indukál. Mutációja következtében ezért nagyobb az esély a DNS károsodás felhalmozódására, genom instabilitásra és ezáltal a daganat kialakulásra [56].

1.1.5.2. Mikroszatellita instabilitás (MSI)

A genomiális instabilitás ezen formáját a sporadikus vastagbél tumorok kb. 15-20%-ában mutatták ki. A mikroszatelliták változó hosszúságú (általában 1-10 nukleotid), bázisisméltalódésekből álló rövid DNS-szakaszok, melyek a genomban elszórtan, a tumor szuppresszor gének régióiban is megtalálhatók.

A mikroszatellita instabilitás során a DNS hibajavító rendszer (mismatch repair /MMR/ rendszer) elveszíti azt a képességét, hogy a DNS replikáció során képződött hibákat kijavítsa. Így nukleotid mutációk (inzerciók vagy deléciók) halmozódnak fel a genomban, valamint a mikroszatellita nukleotid szekvenciák hossza is változik, ezzel nő a daganatok kialakulásának lehetősége [52, 57].

A mikroszatellita státusz meghatározásához 2 mononukleotid (BAT25 és BAT26) és 3 dinukleotid (D5S346, D2S123 és D17S250) lókuszt szoktak megvizsgálni. Magas szintű mikroszatellita instabilitás (MSI-H) esetében a vizsgált lókuszek több, mint 40%-ában kimutatható az instabilitás. Alacsony szintű mikroszatellita instabilitásról (MSI-L) beszélünk, ha a vizsgált mikroszatellita lókuszek kevesebb, mint 40%-ában észlelhető instabilitás. Mikroszatellita stabilitás (MSS) akkor áll fent, ha nincs instabilitás a vizsgált lókuszekben. A MSI-H tumorok nagy része a hMLH1 gén promóter szakaszának DNS metilációja és ennek következtében a hMLH1 gén expressziójának megszűnése miatt alakul ki [41]. A sporadikus MSI-H tumorok általában kevésbé differenciáltak, mucinosusak és proximálisan helyezkednek el.

A hibajavító rendszernek legalább 7 tagja van: a hMLH1 (humán Mut L homológ), a hMLH3, a hMSH2 (humán Mut S homológ), a hMSH3, a hMSH6, a hPMS1 (humán posztmitotikus szegregáció, Mut L homológ) és a hPMS2. A hMLH1 és a hMSH2 fehérjék elengedhetetlenek a hibajavító rendszer működéséhez. A hMLH1 (az esetek kb. 60%-ában), a hMSH2, a hMSH6 és a hPMS2 gének csírvonalbeli mutációját kimutatták a hereditér, polyposissal nem járó colon carcinoma szindrómában (HNPCC vagy Lynch szindróma) szenvedő betegekben [41, 57, 58]. Ez az egyik leggyakoribb (3-5%) familiárisan öröklődő vastagbél daganat. A daganatok átlagosan 45 éves életkor körül jelentkeznek és az esetek 70%-ában a jobb colonsfélben, proximálisan diagnosztizálják őket. Magas kockázatot jelent az olyan, nem vastagbél eredetű daganatok kialakulására is, mint az endometrium, a petefészek, a gyomor, a vékonybél, a hasnyálmirigy, az epeutak, az uréter vagy a vesemedence rosszindulatú daganatai [59].

1.1.5.3. CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP)

A CIMP útvonal a sporadikus vastagbél daganatok kialakulásának megközelítőleg 15%-áért felel [41].

Ezekben az esetekben is mikroszatellita instabilitás következik be, mivel a DNS hibajavító rendszer egyik génjének (általában az MLH1 génnek) promóter régióján található CpG sziget hipermetilációja miatt a hibajavítás inaktívvá válik [8]. A CIMP fenotípus során kialakuló vastagbél daganatok sajátos klinikai jellemzői, hogy proximálisan helyezkednek el, női dominanciával rendelkeznek és rossz a kórjóslatuk [60, 61]. A proximálisan elhelyezkedő sporadikus vastagbél tumorok kb. 30-40%-a, míg a disztális colonfél és a rectum daganatok 3-12%-a CIMP pozitív [61].

A CIMP pozitivitás megállapításához a CpG sziget metilációs marker csoport vizsgálata szükséges. Az optimális CpG sziget csoportok vizsgálata azonban még nem egységes. [61]. A CIMP fenotípuson belül megkülönböztetünk alacsony és magas CIMP kategóriákat [8]. A magas CIMP fenotípusú (CIMP-H) tumorokban gyakori a BRAF és a pMLH1 mutáció és számos marker esetében a metiláció mértéke megnő. Ezzel szemben az alacsony CIMP tumorokban (CIMP-L) gyakori (92%) a K-ras mutációja és kevesebb gén metilációja ismert [62].

Jass és mtsi. 5 molekuláris típust írtak le az MSI státuszt és a CIMP státuszt figyelembe vételével [62]:

1) CIMP-H fenotípusú és MSI-H tumorok. Erre a csoportra a BRAF mutáció és a pMLH1 hipermetilációja jellemző. A sporadikus vastagbél daganatok 12%-a tartozik ide, amelyek általában jobb oldali lokalizációjúak és nőkben gyakrabban fordulnak elő. Általában diploidia, gócos nyáktermelés, alacsony differenciáltság és limfocita infiltráció jellemzi. Kialakulásuk a fogazott (serrated) adenomákkal hozható összefüggésbe, így ezek a daganatok a serrated polyp-dysplasia-carcinoma útvonalat követik [62]. Ez az útvonal az összes vastagbél tumor 10-20%-ának kialakulásáért felelős. A fogazott útvonalra jellemző BRAF vagy K-ras mutáció a MAPK szignál transzdukciós útvonalon keresztül az apoptózis csökkenéséhez, a mirigyek fogazottságának kialakulásához vezet. A mikroszatellita instabilitás azonban nem szükséges a fogazott útvonal kialakulásához [63, 64].

2) CIMP-H fenotípusú és MSS státuszú, fogazott adenomákból kialakuló tumorok. Ezekre a tumorokra részleges hMLH1, p16 és trombospodin-1 metiláció, valamint BRAF mutáció jellemző.

A gyakoriságuk 8%-os, női dominancia érvényesül. Jobb oldali lokalizációjú, diploid, mucinózus és alacsony differenciáltságú tumorok tartoznak ebbe a csoportba [62, 65].

3) CIMP-L fenotípusú, MSI-L tumorok. Előfordulási gyakoriságuk 20%-os, fogazott adenomából vagy hyperplastikus polypból alakulnak ki. K-ras mutáció, O-6-MGMT metiláció jellemző rájuk. Jól differenciált, férfi dominanciájú, bal oldali tumorok tartoznak a csoportba [62].

4) CIMP negatív, MSS tumorok. Ez a leggyakrabban (57%) előforduló típus. Jellemzően bal oldali, sporadikus tumorok tartoznak ide, amelyek típusos adenomákból alakultak ki. K-ras, p53 és APC mutáció jellemző őket, így a korábban már említett FAP betegség is ide tartozik. Továbbá alacsony limfocita infiltráció, jó differenciáltság és a férfi nem dominanciája jellemzi ezeket a tumorokat [62].

5) CIMP negatív, MSI-H státuszú tumorok, amelyek gyakorisága 3%-os. Általában jobb oldaliak, férfi dominanciájúak, valamint mucinózusak, rossz differenciáltságúak, diploidia és lymphocita infiltráció jellemző őket. A hMLH1, a hMLH2 és a hMSH6 gének mutációja gyakori, ezért a korábban ismertetett HNPCC tumorok is ide tartoznak [62].

2. táblázat: A vastagbél daganatok molekuláris és klinikai jellemzői (Jass [62] és Cunningham [8] alapján)

	1	2	3	4	5
CIMP fenotípus	Magas	Magas	Alacsony	Negatív	Negatív
MSI státusz	MSI-H	MSS/MSI-L	MSI-L	MSS	MSI-H
Gyakoriság	12%	8%	20%	5%	3%
APC	+/-	+/-	+	+++	++
K-ras	-	+	+++	++	++
BRAF	+++	++	-	-	-
P53	-	+	++	+++	+
hMLH1 státusz	Metilált	Részben metilált	Metilált	Normális	Mutált
Lokalizáció	Jobb oldal	Jobb oldal	Bal oldal	Bal oldal	Jobb oldal
Nem	Nő	Nő	Férfi	Férfi	Férfi
Differenciáltság	Alacsony	Alacsony	Jó	Jó	Alacsony
Útvonal	"Serrated"	"Serrated"	"Serrated"	CIN	MMR

1.2. DNS metiláció

A DNS metiláció számos gén ki- és bekapcsolódásában játszik szerepet, így részt vesz az egészséges fejlődésben, de kulcsfontosságú a tumorigenezisben is. A folyamat során metil-csoportok épülnek be a DNS nukleotid bázisaiba. Erre több lehetséges célpont is létezik. Az egyik az adeninbázis módosítása az N6 atomján, ez leginkább baktériumokban, illetve a legtöbb eukariótában jellemző. Egy másik, leginkább a *Termophilus* baktériumokban lehetséges metilációs hely, a citozin bázis N4 atomjának módosulása. Leggyakrabban azonban minden organizmusban a citozin bázisok 5. szénatomjának metilációja zajlik le. A metil-csoport és a szénatom közti kovalens kötést a DNS-metiltransferázok (DNMT) katalizálják, létrehozva ezzel az 5-metil-citozin bázist. Az eukarióta sejtekben három DNMT család, a DNMT1, a DNMT2 és a DNMT3 ismert. A DNMT1 és a DNMT3 fehérjék két doménből épülnek fel, az egyik az N-terminális részen egy szabályzó rész, a másik a C-terminálison egy katalizáló egység. A DNMT2 csak a katalizáló részből áll [66, 67]. A DNMT1 fehérje igen fontos a metiláció szabályozásában humán sejtekben, és hozzájárul az embrionális őssejtek differenciálódásához. A DNMT3 fehérjék ezzel szemben, csak a *de novo* metiláció kapcsán aktiválódnak [66, 68, 69, 70].

A metilációs mechanizmus során a metil-csoportot az AdoMet kofaktor, vagy más néven S-adenozil-metionin nyújtja. A reakció első lépése során a citozin kibillen a DNS kettős hélixből és a metiltransferáz enzim szubsztrátkötő zsebéhez kapcsolódik. Majd az enzim aktív helyén, a katalitikus cisztein-tiol egy átmeneti kovalens fehérje-DNS intermedier állapotot alakít ki a citozin 6. szénatomjával. Így reaktív enamin keletkezik, amely a kofaktor által biztosított metil-csoporttal lép reakcióba. Miután a metil-csoport kötődött a citozin C5 pozíciójához, β -eliminációval felszabadul az enzim. Végeredményként tehát 5-metil-citozin keletkezik [66].

Emlősökben a metiláció szinte kizárólag az 5'-citozin-guanin-3' dinukleotidokon (CpG, citozin-foszfo-guanin) történik meg. A humán gének kb. felének promóter régiójában ilyen C-G gazdag szekvenciák, ún. CpG-szigetek (csoportokban, 0,5-4 kb hosszan és 60-70%-os C-G tartalommal előforduló dinukleotid szekvenciák). Normális sejtekben a CpG-szigetek nagy része metilálatlan (kivéve a női inaktív X kromoszómát). Metilált formában azonban egyértelmű közreműködői a géncsendesítésnek, mivel egy promóter régió metilációja ugyanúgy a heterozigotizáció elvesztéséhez vezethet, mint a génmutáció.

Bizonyos promóter régiók fokozott metilációjával (hipermetilációval) különböző gének inaktiválódnak, amelynek következtében fontos sejtfolymatok módosulnak, ezáltal a DNS metilációnak szerepe van a tumorképződésben is. Például tumor szuppresszor gének metilációja során a génátíródás hiánya és a kódoló régiók mutációjának hiánya figyelhető meg, így a folyamat daganat kialakulásához vezet [65, 66, 67]. A daganat kialakulásával összefüggő metilációkat C-típusú (cancer-related) metilációknak nevezzük. Ez a metiláció típus fordul elő a CIMP+ fenotípusú tumorokban [65], amelyekben több gén inaktivációja is kimutatható, mint a tumor szuppresszor génként ismert p16, APC, BRCA1 vagy a DNS hibajavító hMLH1 vagy az O-6-MGMT gének. Minden humán daganat egyedi hipermetilációs mintázattal jellemezhető, de néhány gén metilációja tumor-specifikus, mint a petefészek- és emlődaganatokban ismert BRCA1 gén vagy a vastagbél-, gyomor- és endometrium tumorokban igazolt hMLH1 gén [71].

A DNS metiláció azonban nem csak a tumorgenezis során ismert. A normális egyedfejlődésben is megfigyelhető metiláció típust, az A-típusú (age-related) metilációt az egészséges vastagbél nyálkahártyában is igazolták. Issa és mtsai az ösztrogén receptor (ER) gén CpG-sziget metilációját írták le humán vastagbél nyálkahártya sejtekben az öregedéssel kapcsolatban [72]. Ugyanezen gén metilációját kimutatták adenomákban is, így ez az öregedéssel összefüggő metiláció a tumorgenezis egyik korai lépcsője lehet. Ez részben magyarázhatja a korrall növekvő vastagbél daganat kialakulási esélyt, hiszen a vastagbél daganatok 90%-ban 50 éves kor felett jelennek meg. Az A-típusú metiláció inkább fiziológiás folyamat, mint kóros epigenetikai módosulás, mert igen nagy gyakoriságú, nagyszámú sejt érintett általa, minden egyénben előfordul, nemcsak a tumoros betegekben, és mert ez a folyamat gén- és szövetspecifikus [65, 73, 74].

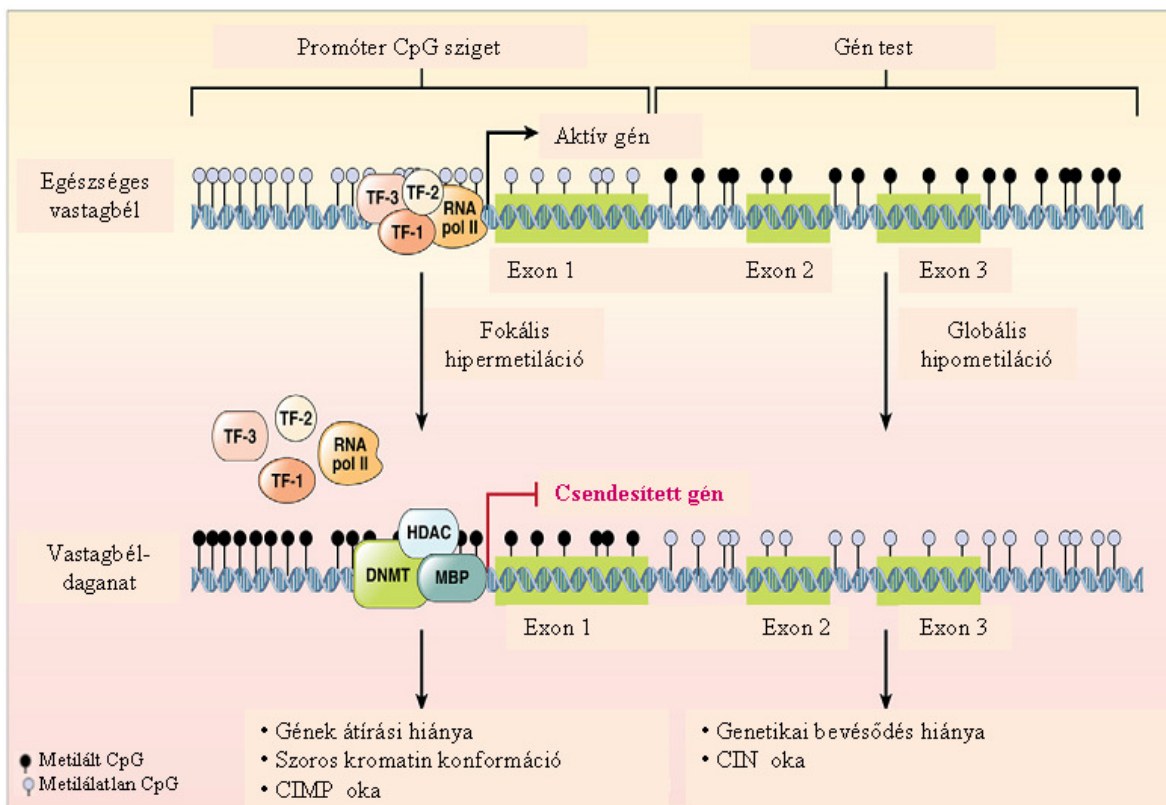
A DNS metiláció három különböző változata ismert: 1) globális hipometiláció; 2) emelkedett DNMT1 szint és 3) regionális hipermetiláció a CpG-szigeteken, ami gyakran magába foglalja a gének promóter régióját is [74].

A genomszintű 5-metil-citozin hiánya a humán tumorokban az egyik legkorábban leírt molekuláris módosulás [75, 76]. A hipometiláció szerepe a tumorgenezisben a növekedés elősegítésében nyilvánul meg, onkogének gén-specifikus hipometilációja által. A fenti változás azonban gyakran a promóteren kívüli CpG-szigeteken történik meg, így a génexpresszióra gyakorolt közvetlen hatása nem tisztázott [71].

A csökkent metiláció a genom stabilitásra is hatással van. Egy korai tanulmányban rágszáló embrionális őssejtet felhasználva vizsgálták a DNMT1 gén hiányát, amelynek hatására a kromoszómális mutációk számában szignifikáns emelkedést észleltek [77, 78].

A genom-szintű hipometiláció egy másik okozója a DNMT1 gén aktivitásának emelkedése [79]. Fokozott DNMT1 aktivitást több tumorban is kimutattak már, például a vastagbél- és tüdődaganatokban vagy daganatos sejtvonalakban [74].

Az egyik legelfogadottabb tényező a humán rákképződésben a promóter régiók *de novo* metilációja. A sporadikus daganatokkal összehasonlítva, a családi halmozódást mutató daganatok majdnem felében az okozó gének promóter régiójának metilációja a felelős a tumor kialakulásáért. A hipermetiláció következménye a metilált gén funkciójának elvesztése, expressziójának csökkenése. A promóter régiók hipermetilációját nemcsak daganatokban, hanem már a rák megelőző állapotokban is kimutatták [74, 78]. (3. ábra)



3. ábra: DNS hipermetiláció által előidézett tumor szuppresszor gén átírási csendesítése vastagbél daganatos és egészséges colon sejtekben [67 - módosítva]

Egészséges sejtekben a tumor szuppresszor gén promóter régióban található CpG-sziget általában metilálatlan, míg a géntestben található dinukleotid ismétlődések metiláltak.

Ez az állapot elősegíti a különböző transzkripciós faktorok (pl. a TF-1, a TF-2 és a TF-3) és az RNS polimeráz II (RNA pol II) promóter régióhoz való kapcsolódását, ezáltal a gén átírását. A vastagbél daganatos sejtekben ezzel szemben a CpG-sziget citozin bázisaihoz metilcsoportok kötődnek, a DNMT enzim közreműködésével. Az így létrejött hipermetiláció gátolja a tumor szuppresszor gén átíródását. Ezzel párhuzamosan, a géntesten DNS hipometiláció tapasztalható, amely a genetikai bevésődés (imprinting) hiányához, valamint kromoszómális instabilitáshoz vezet.

1.3. Cirkuláló szabad DNS (cfDNS) eredete és alkalmazási lehetősége a szűrésben

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányult a perifériás vérben szabadon keringő DNS molekulák kutatására. Humán plazmában való kimutatásukról először 1948-ban Mandel és mtsai számoltak be [80]. Ezt követően a cirkuláló szabad DNS-ről (cfDNS) szóló tanulmányok célpontjai az autoimmun betegségek voltak [81]. Elsősorban rheumatoid arthritisben [82] és szisztémás lupus erythematosusban [82, 83] szenvedő páciensek szérumban figyeltek meg szignifikánsan magasabb keringő DNS szintet, mint az egészséges kontroll mintákban.

Az első, a cfDNS daganatos mintákból való kimutatását célzó tanulmány 1977-ben jelent meg [84]. Leon és mtsai vizsgálatukban 173 daganatos minta (tüdő, emlő, vastagbél, fej-nyaki régió, központi idegrendszer, genitális, urológiai daganatok, leukémia) és 55 egészséges páciens szérumban mintáinak szabad DNS szintjét hasonlították össze radioimmunassay (RIA) segítségével. A kontroll minták 93%-ában a szabad DNS koncentráció 0 és 50 ng/ml közti tartományba esett, míg a tumoros minták felében a koncentráció, a normálhoz hasonlóan, 0-50 ng/ml között mozgott, a másik felében azonban ez a tartomány 50-5000 ng/ml-ig terjedt. A daganatos betegek sugárkezelését követően alacsonyabb szabad DNS szintet mértek, mint a kezelés előtt. Tanulmányukban nem találtak összefüggést a cfDNS szint és a tumor elhelyezkedése vagy mérete között. Ezt követően számos vizsgálat született a szabad DNS szint és a malignitás közötti összefüggésről. A daganatos mintákban kimutatott cfDNS szint tekintetében igen széles a skála. Stroun és mtsai magas cfDNS koncentrációt (12,3 ug/ml) mértek áttétes rectum tumorban szenvedő páciensek plazmájában [85].

Ebben a vizsgálatban az egészséges kontroll csoportban nem észleltek mérhető cfDNS koncentrációt.

Boni és mtsai szintén szignifikáns különbséget mutattak ki vastagbél daganatos és egészséges páciensek plazmájából izolált szabad DNS szint között. Valós idejű PCR (RT-PCR) vizsgálat használatával a kontroll csoportban az átlagos cfDNS koncentráció 0,85 ng/ml volt, míg a daganatos mintáké 4771 ng/ml [86].

Nemcsak a kvantitatív vizsgálatok eredményeztek különbséget a kontroll csoport és tumoros minták között, hanem a szabad DNS genetikai módosulásának kimutatása is. Például a vastagbél daganatban szenvedő páciensek szabad DNS mintáiban a K-ras mutáció és p16 gén hipermetiláció a betegség kiújulásával és a rossz prognózissal van összefüggésben [87, 88]. A vastagbél daganat diagnózisát segítheti a HLTF és a HPP1 gének emelkedett szérumbeli metilációja, bár ezzel a vizsgálattal leginkább az előrehaladott esetek bizonyultak kimutathatónak [89].

A szabad DNS eredetére is több elmélet született. Egy korai vizsgálatban megfigyelték, hogy humán limfociták *in vitro* DNS-t bocsátanak ki a környezetükbe mindenféle befolyásolás, stimulus nélkül. Tanulmányuk szerint a kibocsájtott DNS nem az elpusztult sejtekből származik, mivel ezen DNS mennyisége nem változott az inkubációs idő növelésével és a sejtpusztulási arány sem növelte az extracelluláris DNS mennyiségét [90]. Később két fő mechanizmust, az apoptózist és a nekrotizist tették felelőssé a szabad DNS eredetéért. A daganatos apoptotikus és nekrotikus sejtek tipikus DNS fragmentációs mintázattal rendelkeznek és néhány esetben ezt a mintázatot igazolták a cfDNS vizsgálatokban [91]. Diehl és mtsai tanulmánya szerint a keringő DNS forrásai a nekrotizáló tumorsejtek, ugyanis hasonló mutációt észleltek a szabad DNS-ben, mint a tumorsejtekben. Az invazív tumorok nagy nekrotikus régiókat tartalmaznak, azonban ezek a sejtek közvetlenül nem bocsájtanak ki DNS-t az extracelluláris térbe, hanem a makrofágok által bekebelezett nekrotikus sejtek, majd az azok által megemésztett sejtek DNS-e kerül a véráramba [92]. Tehát vagy a nekrotizáló és apoptotizáló sejtek bocsájtják ki a DNS-t a vérbe, vagy maguk a tumorsejtek lépnek be a keringésbe és azok lízisét követően kerül a DNS szabad formába [93].

A szabad DNS élő tumorsejt-eredetére utal és az apoptotikus út ellen szól, hogy apoptózist indukáló radioterápia ellenére sem növekszik meg a cfDNS szint, valamint az, hogy a korai stádiumban lévő tumoros betegek vérében is kimutatható, ahol viszonylag alacsonyabb az apoptózis és nekrozis aránya.

Szintén ezt támasztja alá, hogy olyan tumoros sejt-kultúra vizsgálatokban is kimutattak a felülúszóban szabad DNS-t, ahol igen alacsony volt az apoptózis vagy a nekrozis [94]. Feltételezik, hogy az onkogén tartalmú cirkuláló DNS-ek intrinsic onkovírusként viselkedhetnek, mert egészséges sejtekbe lépve tumoros transzformációt okozhatnak, ezáltal kulcsszerepük lehet az áttétképződésben is [94].

A szabad DNS eredetének egy újabb megközelítésére utalnak azok a tanulmányok, amelyek a neutrofil granulociták által kibocsájtott extracelluláris csapdákról (NET – neutrophil extracellular traps) számolnak be. A neutrofil granulociták ezzel, a főleg DNS-t tartalmazó hálózattal, az extracelluláris sejtek fertőzőképességét csökkentik és megölik a baktériumokat [95], továbbá szerepük lehet thrombosis kialakulásában is [96, 97]. SLE-ben szenvedő betegekben figyelték meg, hogy a neutrofil granulociták nagyobb mennyiségben szabadítanak fel NET hálózatot, amely a betegség kialakulásához szükséges plazmacitoid dendritikus sejtek krónikus aktivációját okozza [98, 99].

Felmerül a kérdés, hogy a szabad DNS vizsgálatokhoz vérplazma vagy szérum használata javasolt. Steinman vizsgálata szerint, egészséges egyének plazma és szérum mintáit összehasonlítva, a plazma csoportban mérhetetlenül alacsony a DNS szint, ezzel szemben szérumban átlagosan 1,9 ug/ml szabad DNS koncentráció észlelhető. A fentiekből következik, hogy az egészséges egyének plazma mintájában detektált szabad DNS patológiás eseményre utalhat [100]. A szérum és plazma DNS izolátumokat összehasonlítva, a szérumban mért DNS szennyezett lehet sejtes elemekből származó DNS-sel, ezért a vérvételt követően napok múlva is emelkedik a szérum DNS szint [101].

Mindezen vizsgálatok alapján igen nagy figyelem irányult a szabad DNS alapú vizsgálatokra, különböző daganatokkal való összefüggésére.

1.4. A Septin géncsalád

A septin (SEPT) család az evolúció során fennmaradt, P-hurokkal rendelkező GTPáz szupercsaládba tartozó, GTP-kötő és filamentumképző fehérjék csoportja.

Az élesztőgombákban (*Saccharomyces cerevisiae*) mutatták ki őket először, mint a sejtosztódási ciklusban részt vevő Cdc (cell division cycle) géneket [102].

A septinek a sejtosztódásban részt vevő sejtek közötti síkban, az ún. osztódási barázdában helyezkednek el. Feltételezések szerint az anya-leánysejt szétválásakor szükséges nyaki filamentumok képződésében játszanak szerepet, de kölcsönhatásban vannak a citoskeleton alkotóival, az aktinnal és a tubulinnal egyaránt. Ma már ismert, hogy magasabb rendű élőlényekben is megtalálhatók és több sejtfolyamatban - mint a sejtpolaritás meghatározás, a citoskeleton átrendeződés, a membrán dinamika, a vezikula transzport és az exocitózis - is szerepet játszanak, [103].

A septin gének a gerincesekben is fennmaradtak, sőt számuk valószínűleg a génduplikációknak köszönhetően emelkedett. A humán szervezetben eddig 14 septin gént fedeztek fel, közülük néhány nélkülözhetetlen a mitózishoz, míg mások elsősorban a posztmitotikus eseményekben játszanak szerepet. A septinek a diffúziós barrier kialakításán kívül részt vesznek a vezikula transzportban, az apoptózisban és a sejtmozgásban [104].

A septin fehérjék minden szövettípusban kimutathatók, de néhányan közülük magasabb expressziót mutatnak a limfoid szövetekben (1, 6, 9, 12), az agyi szövetekben (2, 3, 4, 5, 7, 8, 11) és a humán testisben (14) [105, 106]. A SEPT2 és a SEPT9 feltehetőleg a citokinézisben játszik szerepet, míg a SEPT5, a SEPT6 és a SEPT9 a tumorgenezisben [103, 107, 108].

Számos septin transzkriptum átesik az alternatív splicing folyamatán, amely során egy adott kódoló szakaszból többféle mRNS is keletkezhet. Az intronokkal (nem kódoló szakaszok) együtt egyes exonok (kódoló szakaszok) is kivágódhatnak a pre-mRNS szekvenciából, ezért ugyanarról a génről képződő érett mRNS eltérő fehérjéket kódolhat. Az emlős septin fehérjék egyik közös jellemzője, hogy több alternatív splicing variánsal rendelkeznek. Például a Septin 9 gén 18 különböző transzkriptuma 15 polipeptidet kódol, hosszú (SEPT9_v1, v2 és v3), közepes (SEPT9_v5) és rövid formában (SEPT9_v4). A septin 9 transzkriptumai közül kettő ugyanazt a polipeptidet kódolja (SEPT9_v4 és SEPT9_v4*). A legújabb kutatások alapján azonban további transzkriptumokra is fény derült, mint a SEPT9_v6 és a SEPT9_v7 [109]. A 18 splice variáns a 6 db (alfa, béta, gamma, delta, epsilon és zéta) 5' vég és 3 db (SV1-3) 3' vég keveredéséből keletkezik [110].

Ez nemcsak a SEPT9-nél fordul elő, ugyanis a SEPT4, a SEPT6 és a SEPT8 géneknél is megfigyeltek hasonló jelenséget. A SEPT6 és a SEPT8 esetében 4-4 izoforma ismert.

A SEPT4 génben az alternatív splicing legalább 6 izoformát eredményez: kettő a mitokondriumban mutatható ki, közülük az egyiknek apoptotikus folyamatokban lehet szerepe. A többi izoforma a citoplazmában található és kapcsolatban lehetnek a daganatok kialakulásával [103, 111].

1.4.1. Septinek összefüggése különböző betegségekkel

A Septin gének eltéréseit több betegségben is kimutatták (pl. neurológiai eltérések, infekciók és daganatos elváltozások), de kórélettani szerepük még nem ismert.

A humán Septin gének egy része az idegrendszerben is termelődik, a SEPT3 gén fokozott működését például idegi differenciációban írták le [112]. Ezért feltehetőleg a Septin géneknek több idegrendszeri betegség kialakulásában is szerepük lehet. A SEPT1, a SEPT2 és a SEPT4 gének az Alzheimer-betegségre jellemző neurofibrilláris plakkok kialakításában játszhatnak szerepet, mivel képesek kötődni a tau-alapú helikális filamentumokhoz [113]. A SEPT2/6/7 fehérjekomplex részt vesz a mikrotubulusok stabilizálásában, ezáltal hozzájárulhat az Alzheimer kórban észlelt, mikrotubulus asszociált kóros tau-aggregátumok állandóságához [114]. A SEPT2 gén GTP-kötő képességének gátlása módosult neuritok képződéséhez vezet, továbbá a gén fokozott expresszióját mutatták ki agyi tumorokban [115]. A SEPT4 felhalmozódását juvenilis parkinsonizmusban [116], míg fokozott SEPT5 expressziót Down szindrómában figyeltek meg [117]. Az autoszomális domináns öröklődést mutató amyotrophia neuralgica genetikai vizsgálata során, a 17. kromoszóma hosszú karján, a SEPT9 génben észleltek mutációkat [118].

A SEPT2, a SEPT9 és a SEPT11 esetében igazolni lehetett, hogy a citokinézisben betöltött szerepük alapján részt vesznek a bakteriális sejtek gazdasejtekbe való bejutásában [119].

A septin gének és a daganatok közti kapcsolat kimutatására leukémiás betegek vizsgálata során került sor. A 11-es kromoszómán található MLL (mixed lineage leukemia protein-1) gén átrendeződése (leggyakrabban kromoszómális transzlokáció formájában) a humán leukémiák kb. 10%-ában megtalálható, de a csecsemőkori leukémiák esetén több, mint 70%-ban igazolták [120].

Az MLL fúziós partnerei között a SEPT2 [121], a SEPT5 [122], a SEPT6 [123,124], a SEPT9 [125] és a SEPT11 [126] is megtalálható.

A legelső fúziós partnerként igazolt septin gén a SEPT9 volt akut myeloid leukémiás betegségben, ezért korábban MSF génnek vagy más néven MLL septin-like fusion génnek nevezték el [127]. Azóta a 11. (MLL gén) és a 17. kromoszóma (SEPT9) közti transzlokációt több, főleg akut myeloid leukémiás esetben írták le.

A másik bizonyíték a septin gének és a daganatok kapcsolatára az ovárium- és emlőtumorokban megfigyelt allél eltérések. Emlődaganatos egérmódelles kísérletekben fokozott SEPT9 génműködést igazoltak, valamint ugyanez a kutatócsoport humán mellrákos sejtvonalat vizsgálva magas SEPT9 expressziós szintet mutatott ki [128]. Humán ovárium- és emlőtumoros vizsgálatokban is a 17-es kromoszóma hosszú karján észleltek teljes vagy részleges allélvesztést, ahol a SEPT9 gén található [129, 130]. Későbbi vizsgálatok a SEPT9 gén egyes transzkriptuma variánsainak elemzését célozták. A különböző transzkriptumokra érzékeny elemzések segítségével igazolható volt, hogy a splice variánsok szövetspecifikusak. A petefészek- és emlődaganatokban a leginkább a SEPT_v1, a SEPT9_v4 és a SEPT9_v4* jelennek meg. Emlődaganat sejtekben a SEPT9_v1 transzkriptum fokozott expresszióját észlelték [131]. A v4 izoforma által kódolt két splice variáns expressziója azonban különbséget mutat: a SEPT9_v4 transzkriptum a magzati és egészséges felnőtt szövetekre jellemző, míg a SEPT9_v4* egészségesekben alacsony szinten mutatható ki vagy mérhetetlen, de daganatokban domináns [132]. Scott és mtsai petefészek daganatsejtekben a SEPT9_v1 és a SEPT9_v4* fokozott működését figyelték meg. A legmagasabb expressziós értéket a serosus és mucinosus borderline tumorokban írták le [133].

A hematológiai és nőgyógyászati tumorokon kívül a septin család tagjait más daganatos elváltozásokban is kimutatták. Urológiai daganatokban a SEPT4 fehérje expresszió 70%-os pozitivitást mutatott prosztatata-, húgyhólyag-, és vesedaganatos betegek vizeletmintájában [134]. A septin fehérjék szerepét agydaganatokban is igazolták. A mutáns SEPT2 fehérje astrocytomákban, a SEPT3 fehérje medulloblastomában, míg a SEPT7 protein negatív korrelációját a gliomákban észlelték [135, 136]. SEPT9 gén metilációt a fej-nyaki daganatok esetében is leírtak [137].

1.4.2. SEPT9 és a vastagbélrák

A septin géncsalád tagjai közül a SEPT9 gén DNS metilációját igazolták vastagbél daganatos betegek esetében.

Lofton-Day és mtsai írták le először a SEPT9 metilációt, mint lehetséges vastagbél-daganat biomarkert. Vizsgálatuk célja perifériás vér alapú epigenetikai markerek kutatása volt vastagbél daganatos betegek mintáiból. Restrikciós enzim alapú technikával 56 lehetséges markert azonosítottak, majd microarray és RT-PCR módszerekkel 3 gént (TMEFF2, NGFR, SEPT9) választottak ki, amelyek megfelelő markerei lehetnének a vastagbél daganatoknak. A SEPT9 gén esetében a daganatos minták 69%-ban észleltek metilációt, míg az egészséges esetek 14%-ában volt kimutatható a metiláció [138]. Később két független csoporton, nagyobb mintaszámon tesztelték a SEPT9 gén metilációját. A validáció során az első mintacsoportban 252 vastagbél tumoros mintából 120 esetben (48%) detektáltak SEPT9 hipermetilációt, az egészséges kontrollcsoport 102 esete körül csupán 7 páciensnél (7%) volt kimutatható a SEPT9 metiláció. A második független csoport vizsgálata során 73/126 daganatos minta (58%) és 18/183 egészséges plazma minta (10%) mutatott metilált SEPT9 pozitivitást. Összességében 72%-os szenzitivitást és 90%-os specificitást tapasztaltak. Vizsgálatukban az 1 cm-nél nagyobb polipok kb. 20%-ában észleltek magas SEPT9 metilációs szintet. Alacsony pozitivitást igazoltak más daganatos minták (11/96) és nem daganatos betegségek (41/315) vizsgálata során [139]. A kimutatási módszer módosítása (új DNS izolálási módszer nagyobb volumenű plazma mintából, javított biszulfid konverziós technika, módosított RT-PCR elemzés) után a SEPT9 metiláció szenzitivitása 68-72%-os, a specificitás 89-93%-os lett [140]. Az új módszert alkalmazva 29-37%-ban figyeltek meg SEPT9 hipermetilációt vastagbél daganat megelőző állapotokban (adenoma és hiperplasztikus polyp esetén) [141]. Egy másik kutatócsoport, eltérő izolációs és detekciós módszert alkalmazva 90%-os érzékenységet és 88%-os fajlagosságot igazolt, valamint az adenomák csoportjában 12%-ban észlelt SEPT9 hipermetilációt [142].

A SEPT9 gén emelkedett metilációs szintjének vastagbél daganatos mintákban történő kimutatására számos eset-kontroll vizsgálat készült. A multicentrikus klinikai kutatások összefoglaló neve PRESEPT (Prospective Evaluation of Septin 9 Performance for Colorectal Cancer Screening) tanulmány lett, amelyet az amerikai-német Epigenomics

cég indított. Az első Európában már kereskedelmi forgalomban kapható teszt az Epi proColon kit, amelyet azon pácienseknek javasolnak, akik elutasítják az egyéb szűrővizsgálatokat.

Az Epigenomics cégen kívül a Quest Diagnostics, az ARUP Laboratory és az Abbott Molecular társaságok is ajánlanak metilált SEPT9 alapú vizsgálatokat [143, 144].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Egyre több vizsgálat bizonyítja, hogy a Septin 9 gén hipermetiláció miatti expresszió csökkenésének szerepe lehet a vastagbél daganatok kialakulásában. Kevés információ áll azonban a rendelkezésünkre a SEPT9 benignus vastagbél eltérésekben, illetve különböző lokalizációjú vastagbél tumorokban való expressziójáról, valamint a SEPT9 gén szöveti és plazma metilációs szintjének összehasonlításáról és ennek a szabad DNS mennyiséggel való összefüggéséről.

Munkám során a következő célokat tűztem ki:

1. A SEPT9 gén metilációs szint eltérések vizsgálata és összehasonlítása perifériás vér és szöveti szinten a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia során;
2. a SEPT9 gén hipermetiláció hatásának tanulmányozása a Septin 9 mRNS, illetve fehérje expresszióra a colorectális adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során;
3. a SEPT9 splice variánsok expressziós vizsgálata lézer mikrodisszekált egészséges és vastagbél daganatos mintákban;
4. a cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata;
5. a metilált SEPT9 szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén és
6. a módszer hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel, mint az FOBT vagy az utánkövetésre használt CEA-meghatározás.

3. MÓDSZEREK

3.1. Minták és betegek

A vizsgálataimhoz használt vér- és szöveti biopsziás mintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük össze. A sebészeti mintavételek a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján történtek.

A mintavételeket a Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) jóváhagyásával végeztük el. A kutatásban részt vevő páciensek teljes körű információt kaptak a vizsgálatokról, ezt követően pedig a TUKEB által jóváhagyott beteg beleegyező nyilatkozatot aláírták. Azon pácienseknél, akiknél felmerült malabszorpció gyanúja, akut egészségügyi beavatkozást igénylő tevékenység szükséges volt a mintavétel idején vagy a vastagbél tumoron kívül más daganatos megbetegedése volt, nem történt mintavétel. A mintavételt megelőzően és a mintavétel időpontjában a tumoros betegek egyike sem részesült radiológiai vagy kemoterápiás daganat kezelésben. Tanulmányunkban minden páciens átesett rutin kolonoszkópos vizsgálaton. Az endoszkópos vizsgálatot követően, a páciensek, minták osztályozása patológiai szövettani elemzést követően történt. A 3. és 4. táblázatban szemléltettem a vizsgálatokba bevont páciensek számát, illetve klinikopatológiai adatait.

3. táblázat. A vizsgálatokba bevont összes betegcsoport klinikopatológiai adatai

	Egészséges/ Ép nyálkahártya	AD	Össz. CRC	CRC I	CRC II	CRC III	CRC IV	CRC NI
Esetszám	141	59	161	31	43	58	27	2
Nő/férfi	88/53	22/37	82/79	13/18	24/19	29/29	14/13	2/0
Átlag- életkor	53,4	67,7	67,52	70,9	70,3	69,8	66,6	60

AD = adenoma, CRC I, CRC II, CRC, III, CRC IV = AJCC rendszer szerinti stádium beosztás, CRC NI = nem ismert a tumor stádiuma

4. táblázat. A vizsgálatokba bevont páciensek száma

	Egészséges /Ép nykh.	AD	Össz. CRC	CRC I	CRC II	CRC III	CRC IV	CRC NI
szövet vs. plazma mSEPT9 RT-PCR	24	26	34	6	11	11	5	1
Biopszia mRNS microarray	7	13	15	0	5	6	4	0
LCM mRNS microarray	6	6	6	0	6	0	0	0
IHC	10	14	13	0	7	5	0	1
Splice variáns RT-PCR	7	0	15	5	6	0	4	0
cfDNS RT- PCR	24	26	34	6	11	11	5	1
mSEPT9 RT-PCR (jobb vs. bal oldal)	94	0	93	25	14	36	18	0

AD = adenoma, CRC I, CRC II, CRC, III, CRC IV = AJCC rendszer szerinti stádium beosztás, CRC NI = nem ismert a tumor stádium, RT-PCR = valós idejű PCR (real-time PCR), LCM = lézer-mikrodisszekció (laser capture microdissection)

3.2. A SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata vérplazma és szöveti mintákon**3.2.1. Mintagyűjtés**

A SEPT9 gén metilációs mintázatának meghatározásához egészséges, adenomás és vastagbél daganatos betegek perifériás vér és szövet mintáit használtuk fel. A vérplazma és szöveti metilációs értékek összehasonlításához ugyanazon páciensről vettünk vér- és szövetmintát. A vizsgálatban 24 egészséges, 26 enyhén diszplasztikus (low-grade dysplasia) adenomás (1 cm-nél nagyobb átmérőjű, vagy szövettanilag tubulovillosus, villosus komponens tartalmú) és 34 tumoros (6 I stádiumú, 11 II stádiumú, 11 III stádiumú, 5 IV stádiumú és egy ismeretlen stádiumú) páciens vér- és szövetmintáit használtuk fel (5. táblázat).

5. táblázat. A SEPT9 gén metilációs szintének meghatározásához használt minták

	Egészséges		Adenoma				CRC				
	24		26				34				
RT-PCR			T	TV	V	NI	I	II	III	IV	NI
			7	15	3	1	6	11	11	5	1

CRC = vastagbélrák, RT-PCR = valós idejű PCR, T = tubuláris adenoma, TV = tubulovillosus adenoma, V = villosus adenoma, I, II, III, IV = AJCC rendszer szerinti CRC stádium beosztás, NI = nem ismert tumor stádium

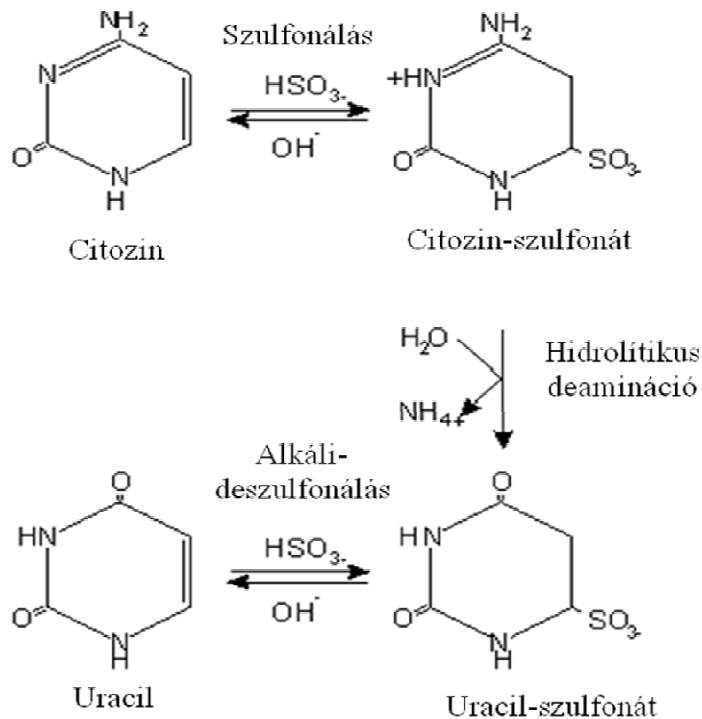
A perifériás vérmintákat a páciensek könyökvénájából vettük le EDTA csövekbe (Vacutainer, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Minden páciensről kb. 9,5 ml vér került levételre. A perifériás véreket a vérvételt követően 4 órán belül lecentrifugáltuk 1350 rcf fordulatszámra és 12 percre, szobahőmérsékleten, majd a felülúszót ismét centrifugáltuk azonos körülmények között. A centrifugálás során hemolizáló minták megsemmisítésre kerültek. A második centrifugációra a magas háttér DNS elkerülése érdekében volt szükség. Az így keletkezett plazma mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

A biopszia mintákat az endoszkópos vizsgálat során vettük. Beteg esetén az elváltozásból, egészséges pácienseknél pedig a vastagbél különböző szakaszaiból, véletlenszerű módon. Az így nyert szövetmintákat nukleinsav stabilizálás miatt azonnal RNAlater (Qiagen, Hilden, Németország) oldatba helyeztük, majd szintén -80°C -on tároltuk felhasználásig.

3.2.2. DNS izolálás és biszulfid konverzió

A biopszia minták esetében az első lépés a minták homogenizálása volt Polytron PT 1600 E asztali szövet homogenizátorral (Kinematica Inc., NY, US). Ezt követően a DNS izolálás a High Pure DNA Mini kit (Qiagen) és a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) segítségével történt. Az így nyert DNS mintákat -20°C -on tároltuk a további felhasználásig.

A plazma minták DNS izolálása esetében, páciensenként 3,5 ml plazmát használtunk az Epi proColon Plasma Quick Kit (Epigenomics AG, Berlin, Németország) alkalmazásával. Az Epi proColon kit ezen része tartalmazza a biszulfid konverzió lépést is. A biszulfid kezelés vagy biszulfid konverzió a DNS metiláció státusz megítélésében van segítségünkre. A folyamat során a nem metilált citozin bázisok a biszulfid só hozzáadásának következtében uracillá alakulnak át, míg az 5. szénatomon metilált citozin nukleotidok változatlanok maradnak (4. ábra). Ezt a molekuláris változást lehet detektálni különböző molekuláris biológiai módszerekkel.



4. ábra. Biszulfid konverzió reakciója

A konverzió során a biszulfid ion kötődik a citozin bázishoz, majd az ezt követő deaminációs lépéssel uracil-szulfonát jön létre. Végül a deszulfonálás eredményként uracil keletkezik. Ezzel szemben az 5-metilcitozin bázisok nem mennek végig a deamináción, így változatlanok maradnak.

Kép forrása:

http://www.methods.info/Methods/DNA_methylation/Bisulphite_sequencing.html

Minden elemzés során, a munkafolyamat eredményességének ellenőrzésére alkalmaztunk ún. külső kontrollokat, melyek a vizsgált SEPT9 metilációra pozitívak, illetve negatívak (Epi proColon Control Kit, Epigenomics AG).

3.2.3. Kvantitatív RT-PCR

A kvantitatív RT-PCR reakcióhoz az Epi proColon kétirányú PCR (duplex PCR) vizsgálatot használtuk (Epi proColon PCR kit, Epigenomics). Az eljárás egy részről olyan biszulfid konvertált DNS szekvenciákat detektál, melyek metilált CpG részeket tartalmaznak a Septin 9 gén v2 régióján, másrészt a β -aktin (ACTB) háztartási gén régióján belüli biszulfid kezelt DNS szekvenciákat is. Így egyidejűleg, azonos reakció során történik a metilált SEPT9 szekvenciák detektálása és a teljes biszulfid konvertált DNS állomány mérése.

A metilált és metilálatlan szekvenciák elkülönítésére az RT-PCR során metilált SEPT9 specifikus fluoreszcens detekciós próbát és biszulfid konvertált, metilálatlan szekvencia specifikus blokkolókat (blockers) használtunk. Így a reakció során csak a metilált szekvenciák amplifikációja történik meg. A duplex PCR a Septin 9 kimutatására olyan primereket tartalmaz, amelyek CpG dinukleotidmentes területekre lettek tervezve. A duplex RT-PCR reakcióhoz LightCycler 480 (Roche, Basel, Svájc) készüléket használtunk, az 6. táblázatban feltüntetett hőciklus alkalmazásával.

6. táblázat. A Septin 9 kvantitatív RT-PCR hőciklusa

	Hőfok (°C)	Idő
Enzim aktiváció	94	20 perc
50 ciklus {	Denaturáció	30 másodperc
	Anneláció	35 másodperc
	Extenzió	5 másodperc
Hűtés	40	30 másodperc

Tekintettel arra, hogy az Epi proColon PCR teszt egy kvalitatív eljárás, a kvantitatív mérésekhez a CT értékek feljegyzését és kalibrációs görbét alkalmaztuk.

A kalibrációs görbéhez biszulfít konvertált, teljesen metilált kontroll DNS-t használtunk (EpiTect bisulfite converted, fully methylated control DNA; Qiagen) 30, 15, 5, 2, és 0,8 ng/PCR hígításokban.

3.2.4. Statisztikai elemzés

Az RT-PCR eredmények értékeléséhez detektálási határokat (CT - cycle threshold) vettünk figyelembe (7. táblázat). Minden minta esetében 3 PCR ismétlést végeztünk. A külső kontrollok elemzése minden esetben szükséges volt. Értékelhetetlen volt a vizsgálat, ha vagy a pozitív vagy a negatív kontrollok bármely futásának CT értéke kívül esett a detektálási határokon. A plazma és a szövet eredményeinek értékeléseit az ún. 2/3-as elemzési módszer szerint végeztük el: SEPT9 hipermetilációt akkor igazoltunk egy mintában, ha a 3 PCR reakcióból legalább 2 a detektálási határon belülre esett (SEPT9: <50 CT, ACTB: $\leq 33,7$ CT). Abban az esetben, ha egy minta 3 PCR ismétléséből legalább 2-nél nem észleltünk SEPT9 görbe emelkedést és az ACTB CT értéke sem lépte át a megadott határértéket ($\leq 33,7$ CT), a minta mSEPT9 negatívnak minősült.

7. táblázat. Az RT-PCR reakciók detektálási határai

	PCR futások	SEPT9 CT	ACTB CT	Eredmény
Pozitív kontroll	3/3	$\leq 40,5$	$\leq 30,3$	Érvényes pozitív kontroll
Negatív kontroll	3/3	--	$\leq 37,1$	Érvényes negatív kontroll
Páciens minta	Min. 2/3	< 50	$\leq 33,7$	SEPT9 pozitív
	Min. 2/3	-	$\leq 33,7$	SEPT9 negatív
	Bármely futás	Bármely CT	> 33,7	Érvénytelen

SEPT9 - Septin 9 gén, ACTB - β -aktin háztartási gén, CT - detektálási határ (cycle threshold)

3.3. A SEPT9 gén hipermetilációjának hatása az mRNS expresszióra

3.3.1. Mintagyűjtés a microarray vizsgálatokhoz

A SEPT9 metiláció mRNS expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatához szövetmintákat használtunk. Vastagbéltükrözés során 7 egészséges, 13 adenomás (6 jól differenciált és 7 rosszul differenciált), valamint 15 CRC-s (5 I stádiumú, 6 II stádiumú és 4 IV stádiumú) betegről vettünk biopsziás mintát. Az így gyűjtött szöveti mintákat azonnal RNAlater (Qiagen) oldatba helyeztük, majd -80°C-on tároltuk felhasználásig.

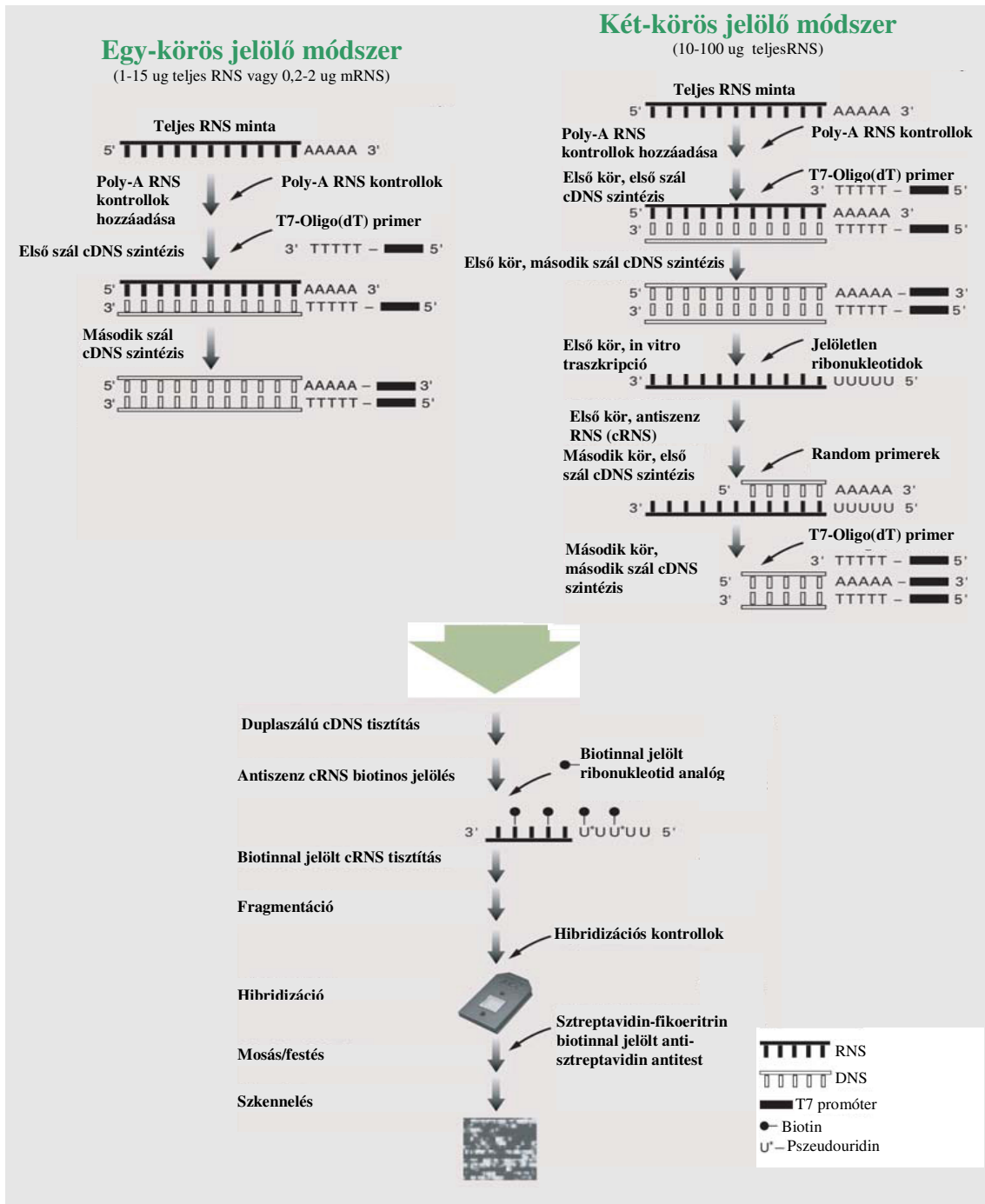
3.3.2. Nukleinsav izolálás, minőségi és mennyiségi ellenőrzés

A biopszia mintákból történő teljes RNS izoláláshoz az RNeasy Mini Kit-et (Qiagen), használtuk a gyártó leírása szerint. A biopsziás minták homogenizálásához Polytron PT 1600 E asztali szövet homogenizátort (Kinematica Inc.) alkalmaztunk. Az RNS mennyiségi ellenőrzésére NanoDrop spektrofotométert (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US), a minőségi ellenőrzésre automatizált kapilláris gélelektroforézist (2100 Bioanalyzer és RNA 6000 Pico Kit, Agilent Inc, Santa Clara, US) használtunk. Az RNS minták minőségét RNS integritási számmal (RIN) lehet jellemezni, amely az RNS degradációjától függően egytől tízes skálán mozog. A kísérletekbe csak a megfelelő minőségű, intakt, 7-nél nagyobb RIN értékű mintákat használtuk fel. A mennyiségi ellenőrzést követően a teljes izolátumot felhasználtuk a microarray vizsgálatokhoz.

3.3.3. Microarray vizsgálat

A biopsziás minták esetében 5-8 µg teljes RNS-ből szintetizáltunk biotinnal jelölt cRNS próbákat egy-körös jelölési módszerrel (One-Cycle Target Labeling), tisztító lépésekkel (Sample Cleanup Module) és in vitro transzkripcióval (IVT Labeling Kit) az Affymetrix rendszer (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) feldolgozási sémáját követve (http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s2_manual.pdf). Ezt követően a kapott cDNS-ek tisztítását (Sample Cleanup Module) és in vitro transzkripcióját (IVT Labeling Kit) végeztük. Minden esetben 10 µg fragmentált cRNS került hibridizálásra a HGU133 Plus2.0 microarray-re (Affymetrix) 16 óráig 45 °C-on.

Az aspecifikus hibridizáció gátlására a gyártó utasítása szerint hering sperma DNS-t (0.1mg/ml Promega, Wisconsin, USA) és szarvasmarha szérumalbumint (BSA) (0.5 mg/ml, Invitrogen, Carlsbad, USA) alkalmaztunk. Ezt követően a chipet GeneChip® Fluidics Station 450 berendezéssel (Affymetrix) történő mosása során eltávolítottuk a nem vagy rosszul kötődött cRNS komponenseket. A festéskor a biotinhoz kapcsolódó sztreptavidin-fikoeritrin (Molecular Probes, Carlsbad, CA) konjugátum által létrejött immunreakció fluoreszcens jeleit detektáltuk a chip leolvasása (GeneChip® Scanner 3000; Affymetrix) során (5. ábra).



5. ábra. Affymetrix microarray vizsgálat lépései

Kép forrása:

http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s2_manual.pdf

3.3.4. Statisztikai kiértékelés

A microarray vizsgálatok statisztikai feldolgozása során elsőként előfeldolgozást végeztünk, amely háttér korrekcióból, normalizációból és összegzésből állt. Ehhez egy félautomatizált módszert, a GCRMA (GeneChip Robust Multiarray Averaging) módszert használtunk kvantilis normalizációval és az ún. median polish összegzéssel [145-147].

A normalizációt követően a különböző csoportok között eltérően expresszálódó géneket SAM (Significance Analysis of Microarray) elemzéssel határoztuk meg [148]. A gének kiválasztásánál a két állapot, stádium között meglévő 2x-es különbséget ($\log_{2}FC > 1$) vettük figyelembe, megfelelő szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés mellett. A szignifikáns eltérést Student t-teszt alapján vizsgáltuk, Benjamini és Hochberg módosítás után [149]. A feldolgozást, adatgyűjtést és statisztikai elemzéseket R 2.14.0 környezetben végeztük [150], Bioconductor könyvtárak alkalmazásával. A betegségcsoportok összehasonlítására hierarchikus klaszter, diszkriminancia, főkomponens elemzéseket és logisztikus regressziót alkalmaztunk. A betegségcsoportok közti eltérések meghatározására ANOVA és post Tukey HSD módszereket alkalmaztunk. Az expressziós szintek ábrázolására boxplot diagrammokat alkalmaztunk, ahol a génextpressziós különbségeket kívántuk megjeleníteni. Szignifikancia határnak minden esetben a $p < 0,05$ értéket vettük.

3.4. A SEPT9 gén metiláció hatása a fehérje expresszióra

3.4.1. Mintagyűjtés

Az immunhisztokémiai vizsgálatához 10 egészséges, 14 adenomás (villosus és tubulovillosus) és 13 vastagbél daganatos (II és III stádiumú) formalinban fixált és paraffinba ágyazott biopsziás mintából 4 μm vastagságú metszeteket készítettünk (8. táblázat).

8. táblázat. A fehérje expressziós vizsgálathoz használt minták

	Egészséges		Adenoma				CRC				
	10		14				13				
IHC			T	TV	V	NA	I	II	III	IV	NI
			0	10	2	2	0	7	5	0	1

CRC = vastagbélrák, IHC = immunhisztokémia, T = tubuláris adenoma, TV = tubulovillosus adenoma, V = villosus adenoma, I, II, III, IV = AJCC rendszer szerinti CRC stádium beosztás, NI = nem ismert tumor stádium

3.4.2. Immunhisztokémia

Deparaffinálást és rehidrációt követően az endogén peroxidázok gátlását végeztük el 3%-os hidrogén-peroxidáz és metanol 30 perces, szobahőmérsékleten történő alkalmazásával. Majd TRIS pufferes (Target Retrieval Solution 10x concentrate, S1699, Dako, Glostrup, Dánia) antigén feltárást végeztük (mikrohullámú antigénfeltárás, 10 perc, 900 W teljesítmény majd 40 perc, 370 W teljesítmény). Az aspecifikus kötéseket kivédésére a metszeteket 1%-os humán szérum albumin oldatban (Albumin from human serum, A1653, Sigma-Aldrich) inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten. Ezután a metszeteket 60 percig, 37 °C-on nedves kamrában inkubáltuk 1:100 hígított Septin 9 poliklonális antitesttel (SEPT9 polyclonal antibody, PAB4799, Abnova, Heidelberg, Németország). A jelkonverzióra EnVision + HRP (Labeled Polymer Anti-Mouse, K4001, Dako) és diaminobenzidin - hidrogén-peroxidáz - kromogén - szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako) használtunk. Végül hematoxylin-magfestést végeztünk (Hematoxylin Solution, GHS132, Sigma-Aldrich). A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan instrument, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (v:1,11,43,0, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország) használtunk.

3.4.3. Statisztikai elemzés

A SEPT9 fehérje expresszió meghatározásának kiértékelése során pontozási rendszert alkalmaztunk, amely a SEPT9 fehérje immunhisztokémiai festés intenzitására vonatkozik. Immunreakció hiányában -2 score értéket kaptak a minták, gyenge reakció során 0 score értéket, közepesen erős festődés esetén +1 és erős, diffúz citoplazmatikus reakció észlelésekor +2 score értéket. A score értékeket hasonlítottuk össze a három mintacsoport között.

3.5. SEPT9 gén és splice variánsainak expressziós vizsgálata lézer mikrodisszekált mintákban

3.5.1. Mintagyűjtés, RNS izolálás

A lézer mikrodisszekált minták mRNS expressziós vizsgálatához sebészeti mintákat használtunk fel 6 olyan daganatos (közepesen differenciált, bal oldali, II. stádiumú) betegtől, akiknél a tumor mellett polypoid képlet is igazolható volt. A mintagyűjtés során szövetdarabokat gyűjtöttük a tumoros lézióból, a mellette található polypoid részből és a makroszkóposan ép területekből is. A szöveti részeket az eltávolítást követően 15 percen belül folyékony nitrogénbe helyeztük és -80°C tároltuk a felhasználásig.

3.5.2. Lézer mikrodisszekció (LCM)

A fagyasztott szövetekből -20°C-on, kriosztátban 6µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket egy speciális membránbevonatú (1 µm PEN), az LCM-hez szükséges tárgylemezre helyeztünk (Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország). Az így elkészített metszeteket -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. A festéshez etanolos hígítási sorban való fixálást követően Cresyl Violet acetát (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) alkoholban oldódó festéket használtunk. A lézeres metszéshez PALM Microbeam rendszert (PALM, Bernried, Németország) alkalmaztunk. Átlagosan 5000 hám és 10 000 stroma sejtet gyűjtöttünk a különböző szövettani területekről.

3.5.3. Nukleinsav izolálás

Az RNS izoláláshoz az RNeasy Micro Kit-et (Qiagen) használtuk a gyártó leírása szerint. Az RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzésekor a 3.3.2. fejezet szerint jártunk el.

3.5.4. Microarray vizsgálat

Az LCM minták esetében igen alacsony a kapott teljes RNS mennyiség (5-50 ng), valamint ennek több mint 90%-a riboszómális RNS (rRNS), így a kiindulási hírvivő RNS-t (mRNS) meg kell sokszorozni. Ehhez a két-körös jelölési (Two-Cycle Target Labeling) módszert alkalmaztuk, amelyben az amplifikáció és a jelölés is megtörténik. A kapott cDNS-ek tisztítását (Sample Cleanup Module) és in vitro transzkripcióját (IVT Labeling Kit), a hibridizálást, a mosási és festési lépéseket a 3.3.3. fejezetben leírtak szerint végeztük.

3.5.5. Valós-idejű PCR

Az izolált teljes RNS 1 µg-jából először reverz transzkripciót végeztünk a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint. A real-time PCR során SYBER Green fluoreszcens módszert alkalmaztunk (LightCycler DNA Master SYBER Green I; Roche). A real-time PCR során β -aktin háztartási gént alkalmaztunk referencia génként. A SEPT9 splice variánsok primer szekvenciái a 9. táblázatban, a hőciklus a 10. táblázatban láthatók. A hőciklus végén végrehajtott oladási görbe (melting curve) vizsgálatral ellenőriztük a képződött termékek specifikusságát.

9. táblázat. β -aktin és Septin 9 splice variáns primer szekvenciák

Primer	Szekvencia (5'- 3')	Termék (bp)
β -aktin F	CCCAGATCATGTTTGAGACCTTC	80
β -aktin R	GCCAGAGGCGTACAGGGATA	
SEPT9 v1F	CGGAGGCACCATGAAGAAGT	84
SEPT9 v1R	GGGCCACTGGAGTCACCAA	
SEPT9 v2F	GCAGCTGGATGGGATCATTTC	88
SEPT9 v2R	GGGTGGGGTGGAGTTGG	
SEPT9 v3F	CGCCGCTGCTAAATATATCC	80
SEPT9 v3R	GACCTCCTCGACCTCAAAGA	
SEPT9 v4F	GGCTCACCTGGTGTCTTGG	85
SEPT9 v4R	GGGTGGGGTGGAGTTGG	
SEPT9 v4*F	GGCAGGAGTGTTCATCTTTTC	61
SEPT9 v4*R	GCGTGCCTCCTGGACA	
SEPT9 v5R	GAGGAAGAGCTCAGGCCACT	80
SEPT9 v5F	CTTGAGCCCGGCATCTCT	

SEPT9 = Septin 9, F = forward primer, R = reverz primer

10. táblázat. A SEPT9 splice variáns RT-PCR vizsgálat hőciklusa

	Hőfok (°C)	Idő	
Enzim aktiváció	95	5 perc	
45 ciklus {	Denaturáció	95	10 másodperc
	Anneláció	61	10 másodperc
	Extenzió	72	20 másodperc
Hűtés	40	30 másodperc	

3.5.6. Statisztikai elemzés

A microarray adatok statisztikai kiértékelése a 3.3.4. fejezetben leírtak szerint történt.

Az RT-PCR vizsgálat eredményeképpen kapott CT (cycle threshold = detektálási határ) értékekből dCT értékeket számoltunk a β -aktin háztartási gén alapján. Végül az expressziót kifejező értéket az összciklusszámhoz hasonlítottuk.

3.6. Cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata

3.6.1. Mintagyűjtés

A szabad DNS mennyiségi meghatározásához 3.2.1. fejezetben szereplő plazma mintákat használtuk fel.

3.6.2. DNS izolálás, kvantitatív PCR

A cirkuláló szabad DNS mennyiségi méréséhez a 3.2.2. és 3.2.3. fejezetekben leírt módszereket alkalmaztuk. A kvantitatív PCR-rel detektált plazma DNS mennyiség túlnyomórészt megfelel a szabad DNS mennyiségnek. A duplex PCR-nek köszönhetően a SEPT9 génnel egy időben az ACTB háztartási gén is kimutatható, amelynek mennyisége a szabad DNS mennyiségével arányos.

3.6.3. Statisztikai analízis

A metilált SEPT9 koncentráció és a szabad DNS mennyiség meghatározásához a korábban leírt (3.2.3. fejezet) kalibrációs görbét használtuk. A különböző csoportok közti szabad DNS szint összehasonlításokhoz ANOVA és Tukey's HSD post-hoc elemzést alkalmaztunk.

3.7. A metilált SEPT9 marker szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén

3.7.1. Mintagyűjtés

A metilált SEPT9 marker érzékenységének és fajlagosságának meghatározásához 94 egészséges és 93 vastagbél daganatos páciens plazmamintáit használtuk fel.

A beavatkozást követően minden páciensről vérmintát vettünk a plazma vizsgálatokhoz. Validáció céljából 40 véletlenszerűen választott páciensnél (16 egészséges és 24 daganatos) 2 x 9,5 ml vérmintát vettünk. A korábban ismertetett módszer szerint centrifugált vérplazma mintákat -80°C-on tároltuk felhasználásig.

3.7.2. DNS izolálás, biszulfid konverzió, kvantitatív PCR

A minták feldolgozásához a 3.2.2. és 3.2.3. fejezetekben említett módszereket és eszközöket alkalmaztuk (Epi proColon Plasma Quick Kit, Epi proColon Control Kit és Epi proColon PCR Kit, Epigemomics AG).

3.7.3. Statisztikai kiértékelés

Az elemzést részben a 3.2.4. fejezet 2/3 módszere szerint végeztük. Korábbi tanulmánnyal [130] való összehasonlítás miatt azonban az ún. 1/3 elemzési módszert is alkalmaztuk, mely szerint egy minta akkor tekinthető pozitívnak, ha a 3 PCR ismétlésből legalább 1 CT értékei a detektálási határon belül esnek. Tehát mSEPT9 pozitív a vizsgált minta, ha a 3-ból 1 PCR replikátum pozitív és mSEPT9 negatív, ha mind a 3 PCR ismétlés negatív lett. Az érzékenység, fajlagosság, valamint a pozitív és negatív prediktív értékek (PPV és NPV) meghatározásához bináris klasszifikációt alkalmaztunk (11. táblázat). A mSEPT9 pozitívitas illetve negativitas eloszlásának meghatározására Pearson-féle kí-négyzet (χ^2) próba diszkrét eloszlású változók vizsgálatára alkalmas statisztikai eljárást alkalmaztunk. A statisztikailag szignifikáns esetekben ($p < 0,05$) a részletesebb elemzés eredményét a Pearson reziduumok segítségével tettük láthatóvá. Az ábrázoláshoz oszlop diagrammot és asszociációs diagrammot használtunk.

11. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékelése

		Aktuális feltétel	
		Pozitív	Negatív
Teszt eredménye	Pozitív	Valós pozitív (TP)	Álpozitív (FP)
	Negatív	Álnegatív (FN)	Valós negatív (TN)

Szenzitivitás: $TP/(TP+FN)$

Specificitás: $TN/(FP+TN)$

PPV: $TP/(TP+FP)$

NPV: $TN/(FN+TN)$

3.8. A metilált SEPT9 marker hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel

3.8.1. Mintagyűjtés

Ezen vizsgálat során a 3.7. fejezet SEPT9 metilációs eredményeit, guajak-alapú széklet teszttel (gFOBT), valamint carcino-embriónális antigén (CEA) teszttel hasonlítottuk össze. A gFOBT teszt (Hema Screen, Immunostics. Inc., New Jersey) során 17 egészséges és 22 daganatos páciens mintáit alkalmaztunk. A széklet mintavétel minden esetben legalább 2 nappal a vastagbéltükrözés előtt történt. A carcino-embriónális antigénnel történő összehasonlításhoz 27 egészséges és 27 daganatos vérmintát használtunk.

3.8.2. Statisztikai kiértékelés

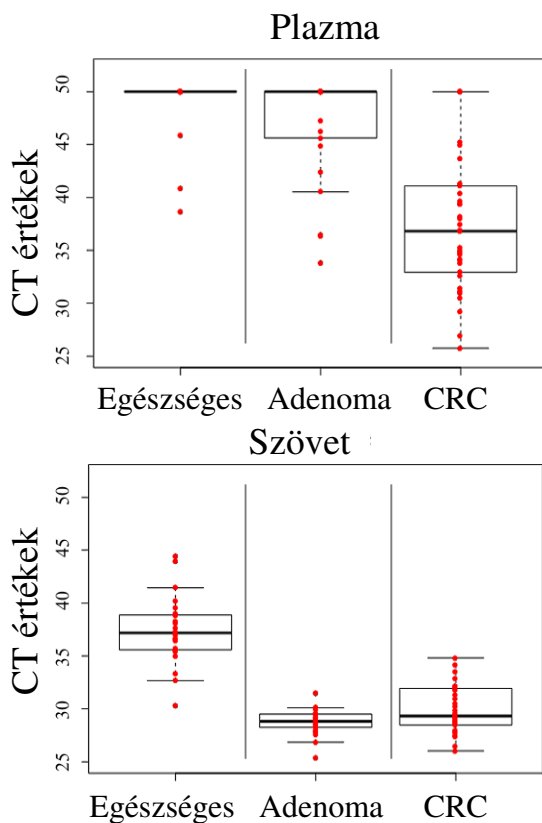
A gFOBT és CEA teszt elemzéseit a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában végezték el. A székletvér mennyiségének észlelési határa 0,6 mg Hg/gm volt. A CEA teszt (Cobas, Roche Diagnostics) mérési tartománya 0,2-1000 ng/mL CEA érték volt. A 4,3 ng/mL feletti értékeket tekintettük kórosnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata vérplazma és szövettani mintákon

A szöveti mintákban, különböző mértékben, de minden csoportban észleltünk Septin 9 metilációt. Erős szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) figyeltünk meg az egészséges vs. adenoma és az egészséges vs. tumor összehasonlítások között. Az adenoma és daganatos csoportok SEPT9 metilációs szintje igen hasonló eredményt mutatott, köztük szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk ($p = 0,14$).

A plazma minták esetén, ezzel szemben, az egészséges mintacsoportban kevés esetben (3/24) mutattunk ki SEPT9 metiláció pozitivitást. Az adenomás betegek plazmájában ez az érték emelkedett, de a legmagasabb metilációs gyakoriságot a tumoros mintákban figyeltünk meg (6. ábra, 12. táblázat).

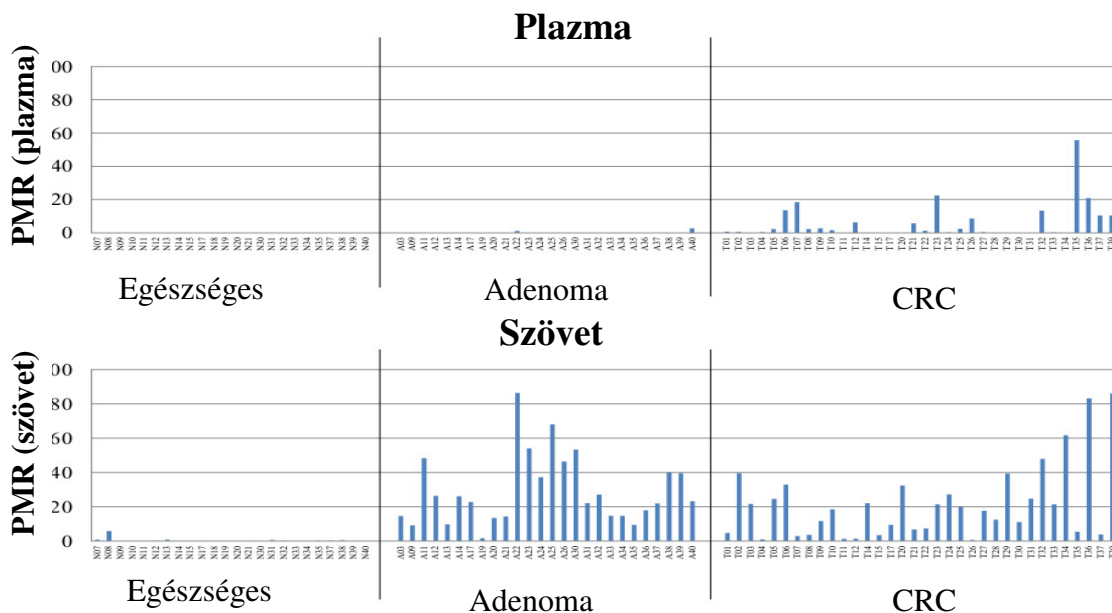


6. ábra. A mSEPT9 kvantitatív RT-PCR CT értékei

Az ép szöveti és plazma mintákat összehasonlítva, a biopsziák esetén mért alacsony SEPT9 metilációs érték a plazma mintákban mérhetetlennek bizonyult.

Szignifikánsan magasabb metilált SEPT9 értéket tapasztaltunk a tumoros csoportban, szöveti ($p < 0,001$) és plazmamintákban ($p = 0,01$) egyaránt. Meglepő módon az adenoma mintákban nem igazolódott ez a hasonlóság a két mintavételi csoport között. Az adenoma biopsziákban a tumorhoz hasonlóan emelkedett metilációt észleltünk, míg az adenomás plazmaminták inkább a normálishoz hasonló SEPT9 metilációs mintázatot mutattak.

Ahhoz, hogy össze tudjuk hasonlítani a metilált SEPT9 jelenlétét szövetben és plazmákban, normalizálnunk kell a metilált DNS mennyiségének és a teljes DNS mennyiségének arányát. Ehhez a metilációs szint százalékos (PMR = percent of methylated reference) értéket használtuk. A PMR értékeket a 7. ábra szemlélteti minden csoportban a szöveti és plazmaminták esetén.



7. ábra. Plazma és szövetminták PMR értékei

A mSEPT9 pozitivitás, illetve negativitás eldöntéséhez a PMR értékek esetében egy határértéket (cut-off) alkalmaztunk. A minták metilációs szintbeli kategorizálását e küszöbérték alapján végeztük. A határérték a biopsziás minták esetében 1% volt, tekintettel arra, hogy a negatív minták PMR értékeinek többsége ezen érték alatt volt. Az egészséges csoportban küszöbérték felettinek mindössze egy minta PMR értéke mutatkozott (1/24; 4,2%).

A plazma PMR értékkel való összehasonlításhoz a plazmaminták esetében is egy küszöbértéket alkalmaztunk. Mivel azonban a DNS szint a plazmamintákban jóval alacsonyabb, mint a szövetben, ez a határérték is alacsonyabbnak, 0,01%-nak adódott. Az egészséges plazmaminták közül csupán 2 esetben (2/24; 8,3%) mértünk ennél magasabb PMR %-ot.

A fentiek alapján, az adenomás plazmamintákban metilált SEPT9 pozitivitást az esetek 30,8%-ában (8/26), míg az adenomás szövetekben 100%-ban (26/26) mértünk.

A daganatos plazmacsoportban az esetek többségénél (30/34; 88,2%) észleltünk SEPT9 metilációt, míg a szöveti tumoros minták 97,1%-ában (33/34) mutattuk ki.

A szövetben mért átlagos PMR érték az adenomás csoportban volt a legmagasabb (29,41%), hasonló metilációs szintet észleltünk a tumor csoportban is (21,52%), míg az egészséges mintákban mindössze 0,52%-ot. A plazmában ezzel szemben a betegség prognózisával párhuzamosan az átlagos PMR értékek is emelkedtek (0,01%, 0,17% és 5,95%) (12. táblázat).

12. táblázat. Plazma és szöveti mSEPT9 PMR eredmények

		Egészséges N=24	Adenoma N=26	CRC N=34
Plazma	PMR átlag (%)	0.01	0.17	5.95
	PMR szórás (%)	0.03	0.57	10.92
	PMR	2/24	8/26	30/34
	gyakoriság > 0.01%	8.3%	30.8%	88.2%
Szövet	PMR átlag (%)	0.52	29.41	21.52
	PMR szórás (%)	1.17	20.26	21.74
	PMR	1/24	26/26	33/34
	gyakoriság > 1%	4.2%	100%	97.1%

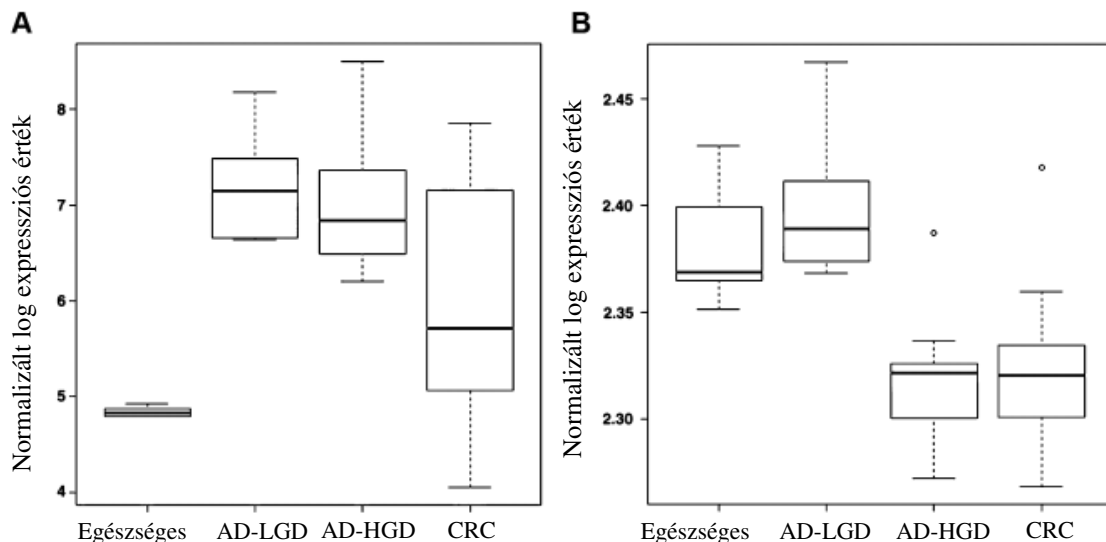
4.2. A SEPT9 gén hipermetilációjának hatása az mRNS expresszióra

A SEPT9 gén mRNS expressziójának meghatározásakor a biopsziák esetében a SEPT9 gén transzkriptumait reprezentáló 4 különböző Affymetrix azonosítót (Affymetrix ID): 207425_s_at, 41220_at, 208657_s_at és 1559025_at (www.affymetrix.com/analysis/index.affx) vettük figyelembe.

A biopsziás mintákban a fenti 4 transzkriptum azonosító közül csak a 207425_s_at és a 1559025_at esetében észleltünk szignifikáns különbséget a csoportok között.

A 207425_s_at transzkriptum expressziós szintje alapján az egészséges biopsziás minták elkülöníthetők voltak az adenomától és a tumortól, ugyanis szignifikáns különbséget ($p < 0,01$) ezen csoportok között találtunk. Hasonló eltéréseket tapasztaltunk továbbá a késői stádiumú daganatok vs. adenoma és korai stádiumú tumorok összehasonlításban ($p < 0,01$).

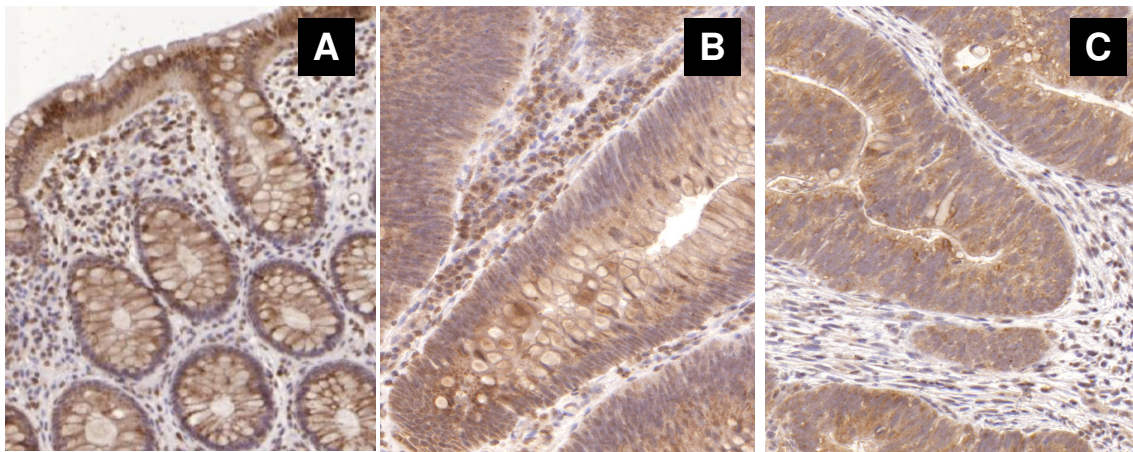
A 1559025_at transzkriptum vizsgálata során ezzel szemben az egészséges minták és az enyhén diszplasztikus adenomák (AD-LGD, adenoma with low-grade dysplasia) hasonló expressziót mutattak, míg a súlyosan diszplasztikus adenomák (AD-HGD = adenoma with high-grade dysplasia) mRNS expressziója a tumorokéhoz állt közel (8. ábra).



8. ábra. Biopsziás minták normalizált logaritmusos expressziós értékei az A, 207425_s_at és B, 1559025_at transzkriptumok esetében

4.3. A SEPT9 gén metiláció hatása a fehérje expresszióra

Az egészséges, adenomás és tumoros szövetminták közül a legerősebb SEPT9 fehérje termelődést az egészségesekben észleltük. Ép mintákban a lumenális epitélium felé egyre intenzívebb, diffúz SEPT9 fehérje expressziót mutattunk ki, amit a korábban már részletezett pontozási rendszer alapján +2 score értékkel jellemeztünk. Az adenomás és tumoros mintákban ennél gyengébb SEPT9 festődési intenzitást észleltünk. Az adenomás minták döntő részében elsősorban a hámsejtek apikális citoplazmájában tapasztaltunk közepes vagy gyenge immunreakciót (+1 score érték). A legtöbb tumoros mintában azonban a SEPT9 festődés elég heterogénnek bizonyult. A gyenge, diffúz citoplazmatikus fehérje expressziót néhány területen intenzívebb immunfestődés váltotta fel (0 és +1 score értékek) (9. ábra).



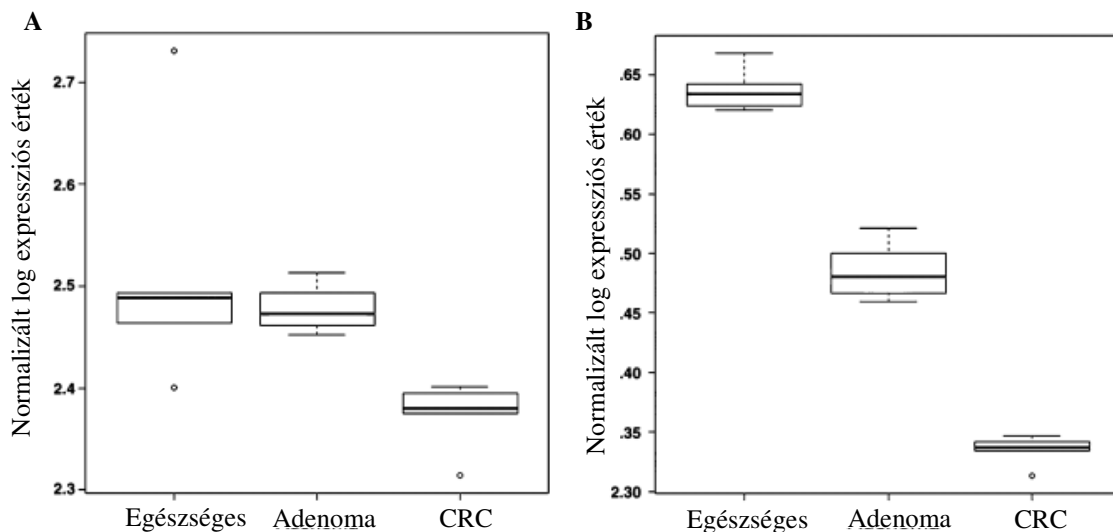
9. ábra. A Septin 9 fehérje expresszió immunhisztokémiai elemzése A, egészséges, B, adenomás és C, tumoros mintákon

A pontozási rendszert nemcsak a SEPT9 fehérje expressziós szintjének meghatározására, hanem a csoportok közötti összehasonlításnál is alkalmaztuk. A legintenzívebb festődést mutató (+2 score értékű) egészséges mintacsoportban a SEPT9 fehérje kifejeződést 100%-osnak (10/10) tekintettük. Ehhez képest az adenomákban 42,8%-os (6/14) volt a +2 score értékű immunreakciót mutató sejtek aránya, míg a tumoros mintákban 38,4%-os (5/13).

4.4. A SEPT9 mRNS expresszió vizsgálata lézer mikrodisszekált mintákon

4.4.1. SEPT9 mRNS expresszió vizsgálat microarray-en

A lézer mikrodisszekált mintákban csak a 1559025_at SEPT9 azonosítójú transzkriptum esetében észleltünk szignifikáns különbséget a mintacsoportok között. A stromasejtek vizsgálatakor, az egészséges és adenomás minták hasonló expressziót mutattak, míg a tumoros sejteknél ettől eltérő mRNS szintet mértünk. Az epitélium esetében az adenoma-carcinoma szekvenciának megfelelően csökkent a SEPT9 mRNS expressziós szint. Szignifikáns különbséget észleltünk a normális vs. adenoma ($p < 0,05$) és a normális vs. tumor ($p < 0,01$) összehasonlításokban (10. ábra).



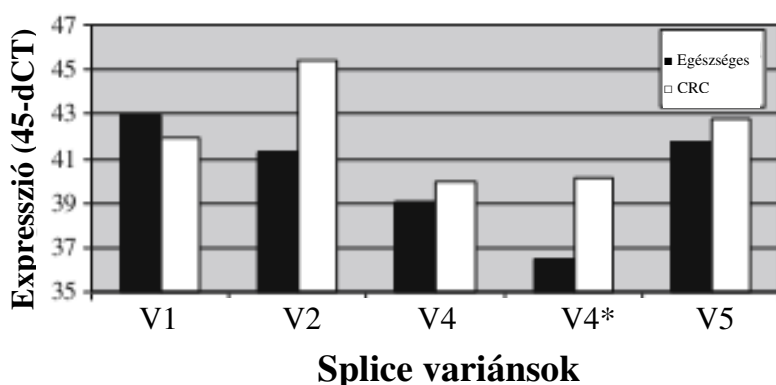
10. ábra. A 1559025_at azonosítójú SEPT9 transzkriptum normalizált logaritmusos expressziós értékei lézer mikrodisszekált A, stroma és B, epitélium mintákon

4.4.2. SEPT9 mRNS splice variánsok expressziójának elemzése

A SEPT9 splice variánsok expressziós vizsgálatához a lézer mikrodisszekált hámsejtmintákat használtunk, tekintettel arra, hogy a hámokban észleltünk nagyobb különbséget az ép és a tumoros mintacsoportok között.

A SEPT9_v1, v2, v3, v4, v4* és v5 splice variánsok közül az ép vs. tumor összehasonlításban a legnagyobb (17,4x) különbséget a SEPT9_v2 esetében észleltük.

Erős expressziós különbséget tapasztaltunk a SEPT9_v4* variáns esetében is (12,5x), és hasonló mértékű SEPT9_v4 és v5 expressziós eltérést is megfigyeltünk. Ezen a splice variánsok esetében a tumoros mintákban mértünk magasabb expressziós szinteket. Egyedül a SEPT9_v1 variáns esetében mértünk az ép mintákban magasabb expressziót, bár a tumoros mintacsoportban tapasztalt expressziótól való eltérés mértéke igen alacsony volt (0,5x) (11. ábra).



11. ábra. A Septin 9 splice variánsok expressziós szintjei lézer mikrodisszektált epitélium mintákban

4.5. A cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata

A szabad DNS mennyiségének meghatározását duplex PCR segítségével végeztük, β -aktin háztartási gén alkalmazásával. Az 3.2.1. fejezetben leírt minták közül két egészséges és 2 adenomás páciens plazmamintáját ki kellett zárunk a vizsgálatból, mivel ezekben az esetekben kiugróan magas szabad DNS szintet mértünk. A páciensek adatainak felülvizsgálatakor észleltük a betegek gyulladási paramétereinek emelkedését, ami a vizsgálat időpontjában még ismeretlen volt.

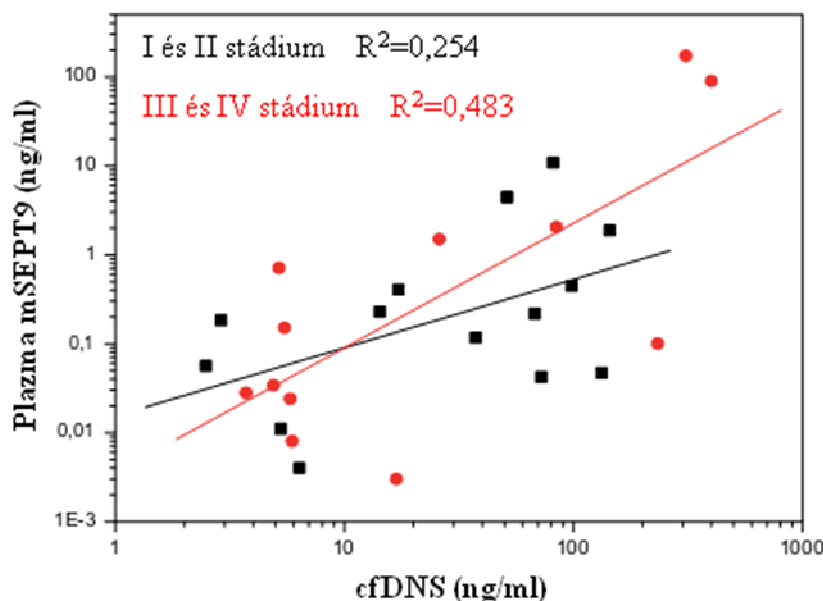
Mindhárom mintacsoportot (egészséges, adenoma, tumor) megvizsgálva, szignifikáns különbséget ($p < 0,01$) csak az egészséges és daganatos minták összehasonlításakor találtunk. A mért átlagos szabad DNS mennyiség normális plazmaminták esetében 20,52 ng/ml, az adenomás mintákban 37,64 ng/ml és a tumoros minták esetében 70,32 ng/ml volt (13. táblázat).

13. táblázat. A szabad DNS mennyisége egészséges, adenomás és tumoros betegek plazmamintáiban

	Egészséges	Adenoma	CRC
	N=24	N=26	N=34
cfDNS átlag (ng/ml)	20,52	37,64	70,32
cfDNS szórás (ng/ml)	24,01	27,74	91,47

cfDNS = circuláló szabad DNS

Ezután a SEPT9 metilációs szintet hasonlítottuk össze a szabad DNS szinttel. Az összehasonlításba csak a mSEPT9 pozitivitást mutató daganatos mintákat vontuk be, mivel a daganatból származó DNS a circuláló szabad DNS egy részét alkotja. Külön összehasonlításokat végeztük a tumor progressziójának megfelelően azért, hogy pontosabb képet kapjunk a daganatos mintákban található összefüggésről. Az I., II. és III. stádiumú tumorok esetében nem találtunk szoros összefüggést a plazma SEPT9 metilációja és a szabad DNS mennyisége között ($R^2 < 0,4$). A IV. stádiumú daganatokban azonban igen erős korrelációt ($R^2 = 0,93$) észleltünk, az igen alacsony mintaszám ellenére. Ezért szétválasztottuk a tumoros mintacsoportot nagyobb mintaszámot szolgáltató korai (I. és II. stádium) és előrehaladott (III. és IV. stádium) egységekre. Az elemzést az új csoportbeosztás alkalmazásával megismételve, a korai daganatok esetén gyengébb ($R^2 = 0,254$) a késői tumoroknál erősebb ($R^2 = 0,483$) kapcsolatot tapasztaltunk. A fentiek alapján látszik, hogy a mSEPT9 plazma biomarker szintje leginkább az áttétes tumorokban korrelált a szabad DNS mennyiségével (12. ábra).



12. ábra. A szabad DNS és a SEPT9 metilációs szint korrelációja tumoros mintákban

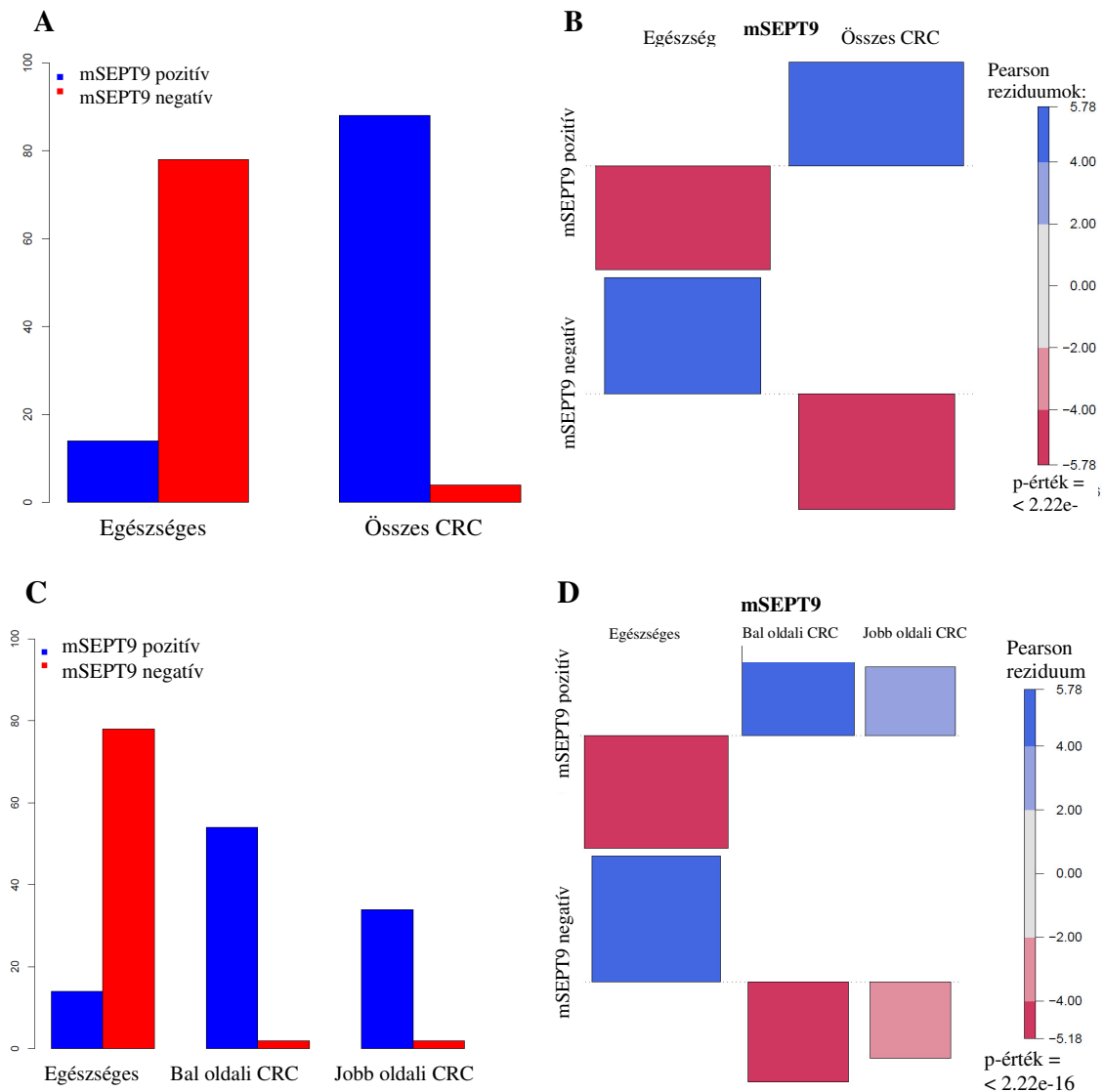
4.6. A mSEPT9 marker szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén

A vizsgálatban a 3.7.1. fejezetben leírt 94 egészséges és 93 daganatos plazmamintát használtuk, amelyekből összesen 40 minta esetében (16 egészséges és 24 tumoros) kétszer végeztük el a vizsgálatot validáció céljából. A fenti minták közül 2 egészséges és 1 daganatos minta esetében SEPT9 metiláció pozitivitást és negativitást egyaránt tapasztaltunk a párhuzamos vizsgálatok során, ezért ezeket a mintákat a további vizsgálatokból kizártuk. Összesen tehát 92 egészséges és 92 tumoros (56 bal oldali colonfél, 36 jobb oldali colonfél) plazmaminta összehasonlítását végeztük.

Az összehasonlítás során a 3.2.4. és a 3.7.3. fejezetekben részletezett, 1/3 és 2/3 elemzési módszereket alkalmaztuk. Az 1/3 szabályt követve az egészséges minták 15,2%-a (14/92) mutatott mSEPT9 pozitivitást, míg a tumoros minták esetén ez az érték 95,6%-osnak bizonyult (88/92). A lokalizáció szempontjából nem tapasztaltunk különbséget a SEPT9 metilációs szintben: a bal oldali tumorok 96,4%-ánál (54/56), a jobb oldali tumorok 94,4%-ánál (34/36) észleltünk pozitivitást.

Mindkét oldali tumoros csoportból 2-2 minta volt mSEPT9 negatív (14. táblázat). A tumoros csoportot AJCC szerinti stádiumokra felbontva, a II. stádiumtól kezdve minden minta mSEPT9 pozitívnak bizonyult, míg az I. stádiumban a minták csupán 84%-a (21/25) mutatott mSEPT9 pozitivitást (16. táblázat). A fenti elemzési módszert követve a mSEPT9 marker szenzitivitása 95,6%-os (95%-os konfidencia intervallum 89,2%-98,8%), specificitása 84,8%-os (95%-os konfidencia intervallum 75,8%-91,44%) volt (13. ábra, 15. táblázat).

A 2/3 elemzési módszert alkalmazva, az egészséges mintákból csupán egy esetben tapasztaltunk mSEPT9 pozitivitást (1%; 1/92). A tumoros minták esetében is kevesebb bizonyult mSEPT9 pozitívnak (79,3%; 73/92). Lokalizáció szerinti összehasonlításban is kisebb eltérést tapasztaltunk. A bal oldali tumoros minták 85,7%-ában (48/56), míg a jobb oldaliak 69,4%-ánál (25/36) észleltünk SEPT9 metilációt (14. táblázat). A 2/3 elemzési módszerrel 99%-os specificitást (95%-os konfidencia intervallum 94,1-100%) és 79,3%-os szenzitivitást (95%-os konfidencia intervallum 69,6-87,1%) tapasztaltunk (15. táblázat). Az alacsony szenzitivitás miatt a tumoros stádiumok összehasonlításánál is alacsonyabb értékeket kaptunk (60%-77,8%) (16. táblázat).



13. ábra. Egészséges és tumoros (jobb és bal oldali) minták mSEPT9 eredményei A, C, oszlop diagrammon és B, D, asszociációs diagrammon ábrázolva

Az oszlop diagrammokon (A, C) kékkel a mSEPT9 pozitív, pirossal a mSEPT9 negatív eseteket jellemeztük. Az asszociációs plotokon (B, D) a Pearson reziduuumok segítségével tettük láthatóvá a mSEPT9 pozitivitás illetve negativitás eredményeit. Kékkel a várható értékhez képest történő növekedést, pirossal a várható értékhez képest történő csökkenést.

14. táblázat. Az egészséges és tumoros minták mSEPT9, gFOBT és CEA eredményei

	Egészséges (%)	Összes tumor (%)	Bal oldali tumорок (%)	Jobb oldali tumорок (%)
mSEPT9 pozitív (1/3)	14/92 (15,2)	88/92 (95,6)	54/56 (96,4)	34/36 (94,4)
mSEPT9 negatív (1/3)	78/92 (84,8)	4/92 (4,3)	2/56 (3,6)	2/36 (5,5)
mSEPT9 pozitív (2/3)	1/92 (1)	73/92 (79,3)	48/56 (85,7)	25/36 (69,4)
mSEPT9 negatív (2/3)	91/92 (99)	19/92 (20,6)	8/56 (14,3)	11/36 (30,6)
gFOBT pozitív	5/17 (29,4)	15/22 (68,2)	10/12 (83,3)	5/10 (50)
gFOBT negatív	12/17 (70,6)	7/22 (31,8)	2/12 (16,7)	5/10 (50)
Emelkedett CEA	4/27 (14,8)	14/27 (51,8)	9/15 (60)	5/12 (41,7)
Normális CEA	23/27 (85,2)	13/27 (48,1)	6/15 (40)	7/12 (58,3)

15. táblázat. Az mSEPT9, a gFOBT és a CEA szenzitivitása és specificitása

	Szenzitivitás (%)	95 % CI (%)	Specificitás (%)	95% CI (%)
mSEPT9 (1/3)	95,6	98,2-98,8	84,8	85,8-91,4
mSEPT9 (2/3)	79,3	69,6-87,1	98,9	94,1-100
gFOBT	68,2	45,1-86,1	70,6	44-89,7
CEA	51,8	31,9-71,3	85,2	66,3-95,8

16. táblázat. A mSEPT9 eredmények a tumorstádiumoknak megfelelően

	Összes tumor (%)	I. stádium (%)	II. stádium (%)	III. stádium (%)	IV. stádium (%)
mSEPT9 pozitív (1/3)	88/92 (95,6)	21/25 (84)	14/14 (100)	35/35 (100)	18/18 (100)
mSEPT9 pozitív (2/3)	73/92 (79,3)	15/25 (60)	13/14 (92,8)	31/35 (88,6)	14/18 (77,8)

4.7. A mSEPT9 marker hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel

A 3.7.1. fejezetben leírt, majd az 4.6 fejezetben részletezett okok miatt kizárt minták gFOBT és CEA eredményeit gyűjtöttük össze retrospektíven. Összesen 17 egészséges és 22 tumoros mintánál rendelkezünk gFOBT eredményekkel, míg rutin laboratóriumi CEA értékek 27 egészséges és 27 tumoros páciens esetében álltak rendelkezésünkre.

Az egészséges páciensek 29,4%-ánál (5/17), míg a tumoros betegek 68,2%-ánál (15/22) tapasztaltunk occult vérzést. A tumoros betegek esetében a várt módon több ($p=0,09$) bal oldalánál (83,3%; 10/12) észleltünk gFOBT pozitívítást, mint a jobb oldaliaknál (50%; 5/10) (14. táblázat). Vizsgálatunkban a gFOBT szenzitivitása vastagbél tumorokra csupán 68,2%-osnak (95%-os konfidencia intervallum 45,1-86,1%), specificitása 70,6%-osnak (95% konfidencia intervallum 44-89,7%) bizonyult (15. táblázat).

A CEA összehasonlításban pozitívnak tekintettük azt a csoportot, ahol a megadott normális értékeknél magasabb CEA értékeket kaptunk. Ez alapján a 27 egészséges páciens közül összesen 4-nél (14,8%), a tumoros csoportban 14-nél (51,8%; 14/27) tapasztaltunk CEA pozitívítást. Az emelkedett CEA értékeket figyelembe véve, ennél a vizsgálatnál sem észleltünk szignifikáns különbséget ($p=0,34$) a jobb (41,7%; 5/12) és bal oldali (60%; 9/15) tumorok között (14. táblázat). Bár a CEA emelkedést szűrésre nem használják, megvizsgáltuk a módszer érzékenységét és fajlagosságát vastagbél tumorokra: a szenzitivitása 51,8%-os (95%-os konfidencia intervallum 31,9-71,3%), specificitása 85,2%-os (95%-os konfidencia intervallum 75,8-91,4%) volt (15. táblázat).

5. MEGBESZÉLÉS

A vastagbél daganatok esetében kulcsfontosságú a korai diagnózis és a felismerést minél hamarabb követő kezelés. Ehhez megfelelő érzékenységű és fajlagosságú, a páciensek számára is elfogadható szűrő módszer szükséges. Szakmai szempontból, napjainkban a vastagbél tükrözés a leghatékonyabb szűrési módszer, azonban a betegek kevésbé nyitottak erre az invazív technikára. Az alacsony compliance javítása érdekében a vizsgálatot gyakran altatásban, bódításban végzik, azonban ennek ellenére igen kicsi a szűrésre jelentkezők részvételi aránya.

A vastagbél tükrözés további hátránya, hogy nagy populációra elsődleges szűrő módszerként, eszköz és szakember hiány miatt nehezen alkalmazható.

Munkám során egy olyan vastagbél daganatra specifikus biomarkert, a metilált Septin 9 gént tanulmányoztam, amelynek vizsgálata nagy mintaszám esetében is egyszerűen kivitelezhető és minimálisan invazív, ezért megfelelő elsődleges szűrő módszer lehet. Vizsgálataimban a SEPT9 gén metilációs szintjét nemcsak perifériás vérben, hanem szöveti szinten is megmértem. Az összehasonlítás során igazoltam, hogy a metilált SEPT9 szöveti és plazma szinten is alkalmazható vastagbél tumorok szűrésére.

A vastagbél tumorok korai diagnózisa céljából, a SEPT9 gén metilációját az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során is megvizsgáltam, valamint a korai, illetve késői vastagbél tumorok SEPT9 metilációs szintjét is összehasonlítottam. Vizsgálataim alapján elmondható, hogy a mSEPT9 markernek fontos szerepe van a vastagbél daganatok korai kimutatásában nemcsak szövetből, hanem perifériás vérből is.

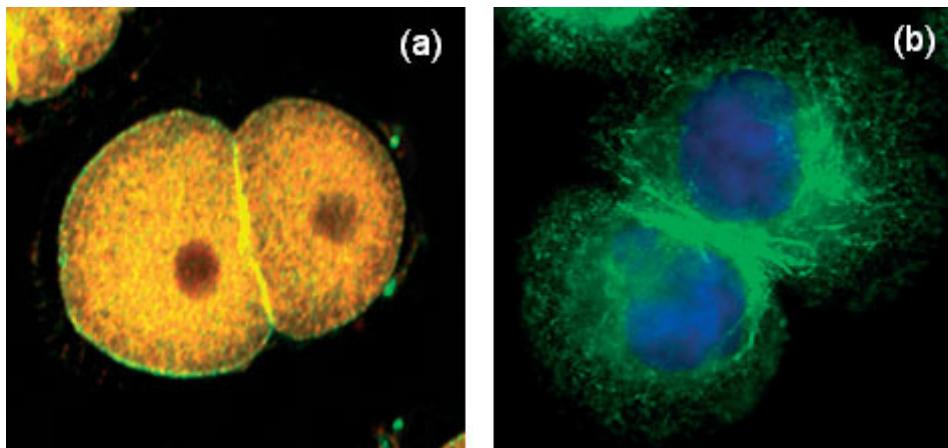
5.1. A septinek szerepe a különböző sejtfolyamatokban és a tumorigenezisben

A Septin géncsalád néhány tagjáról, a SEPT2-ről, a SEPT7-ről és a SEPT9-ről kimutatták, hogy különböző mértékben, de szinte minden szövetben expresszálódnak. A fenti gének egyedfejlődés során változó/történő kifejeződéséről keveset tudunk, annyi azonban ismert, hogy genetikai ablációval módosított, SEPT7, SEPT9 és SEPT11 génhiányos egerek embrionális korban elpusztultak, így ezeknek a géneknek létfontosságú élettani szerepük lehet az embriogenezis során [151].

Erre utalnak olyan humán tanulmányok is, amelyekben magas SEPT9 metilációs szintet észleltek terhes nők plazmamintáiban [142].

A septinek emlős egyedfejlődésben betöltött pontos szerepe még nem ismert, de néhány más modell organizmus vizsgálata rávilágított a lehetséges funkciók egy részére.

Körülbelül 40 éve, először az élesztőgombákban mutatták ki, hogy a septin család tagjainak létfontosságú szerepük van a sejtosztódásban (14. ábra) [152].

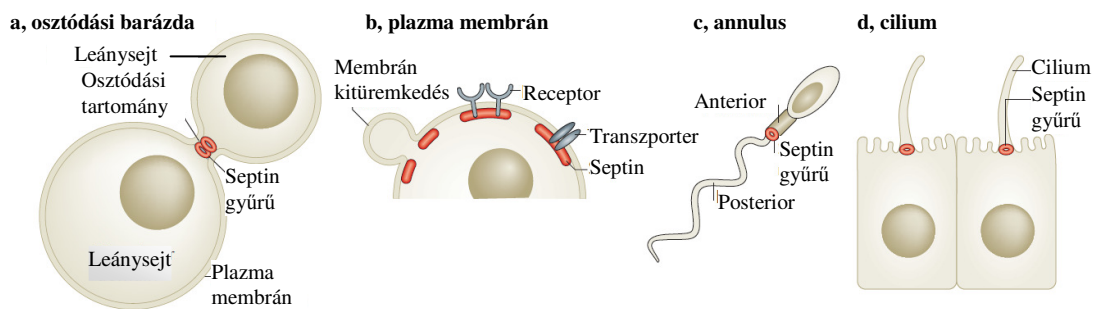


14. ábra. A septin fehérjék elhelyezkedése a, *C. elegans* és b, humán sejtek osztódása során [103]

Az ecetmuslicák (*Drosophila melanogaster*) egyedfejlődése során a septin hiányos embriók elpusztulását a többmagvú blastodermek cellularizációjának hiánya okozza [151]. Fonálférgek (*Caenorhabditis elegans*) vizsgálatakor a septineket leginkább az osztódási barázdában észlelték, azonban nem bizonyultak létfontosságúnak az egyedfejlődésük során. A septin mutációk a fonálférgeknél hatással vannak posztembrionális fejlődésre, ami eltéréseket okoz a gonádok fejlődésében és az érző- valamint motoros rendszer funkcióiban [151]. Egérmodellekben az immunrendszerben mutatták ki a septinek szerepét. Ezekben az állatokban 5-10-szeres SEPT9 expressziót figyeltek meg a T-sejt fejlődés során a $CD4^-CD8^-$ és a $CD4^+CD8^+$ stádiumok átmenete között [153].

Minden eukariótában, így az emberi szervezetben is ismert, hogy a septinek a hetero- és oligomer fehérjék polarizálásával szabályozzák a sejtfolyamatokat, azonban a pontos molekuláris mechanizmusról keveset tudunk.

Heteromer komplexek kialakításával filamentumokat tudnak képezni, amivel különböző sejtfolyamatokban vehetnek részt (15. ábra). Ilyen a már említett sejtosztódás, ahol a diffúziós határon helyezkednek el. A nem osztódó sejtek plazmamembránjához is kapcsolódnak septin fehérjék, hogy megtámasszák a sejtmembránhoz kötődő fehérjéket, ezzel a sejt merevségét is biztosítják. Az emlős spermatozoon annulus-ban is kimutatták őket, valamint a ciliáris és plazmamembránt elválasztó fehérjegyűrűt is a septinek alkotják [152].



15. ábra. A septinek szerepe a különböző biológiai folyamatokban [152 - módosítva]

A tumorigenezisben betöltött szerepük valószínűleg a felborult sejtosztódási aránnyal magyarázható. A SEPT4 az apoptózist segíti elő, csökkent működése az apoptózis hiányát és magasabb sejtszámot idéz elő. A SEPT9 gén fokozott expressziója elősegíti a sejtmotilitást, ezáltal a tumorok fejlődését [154].

5.2. A SEPT9 gén metilációjának vizsgálata a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során

A SEPT9 gén hipermetilációját több tanulmány is leírta vastagbél daganatban szenvedő páciensek vér, illetve biopsziás mintáiban [138-144]. Vizsgálatunkban a biopsziás és perifériás vérmintákat azonos páciensektől gyűjtöttük, ezzel összehasonlíthatóvá vált a szöveti és a plazmabeli SEPT9 metilációs szint. A tumoros és egészséges kontroll mintákon kívül, a rákmegelőző stádiumnak megfelelő adenoma mintákat is bevontunk vizsgálatainkba.

Kísérleteinkben az adenomás és tumoros szöveti mintákban szignifikánsan magasabb SEPT9 metilációs szintet észleltünk, mint az egészséges kontroll csoportnál. Érdekes módon azonban a kontroll biopsziás mintáknál is tapasztaltunk SEPT9 metilációt, bár csekélyebb mértékben, mint az adenomás vagy tumoros mintacsoportok esetében. A metilációs szintek százalékos értékei (PMR) nagy szórást mutattak, de a tumoros (21,5%) és adenomás (29,4%) állapotoknál hasonló mértékű SEPT9 metilációt figyeltünk meg, míg az egészséges mintacsoportban ennél mintegy 40x alacsonyabbat (0,52%).

Az azonos betegektől származó szöveti és plazmaminták összehasonlítása során a legfontosabb észrevétel az adenomás mintacsoportban mutatkozott.

A szöveti adenomás minták jelentősen emelkedett metilációs mértékével szemben, az adenomás plazmacsoportban csupán gyenge mSEPT9 jelet észleltünk. Fenti eredményeinket korábbi tanulmányok is alátámasztják. Warren és mtsai [142] az adenomás plazmaminták csupán 12%-ánál mutattak ki mSEPT9 pozitivitást, bár a SEPT9 metiláció mértéke változhat az adenomák méretétől és típusától függően [139, 141]. Egy másik vizsgálat szerint a plazma mSEPT9 marker érzékenysége adenomákra csupán 14% [155].

A plazmaminták esetében csak a tumoros csoportban észleltünk jelentős SEPT9 metilációt. Ezzel szemben, az ép szövetmintáknál is tapasztaltunk kisfokú SEPT9 metilációt, amiből arra következtethetünk, hogy a Septin 9 génnek és géntermékeinek élettani szerepe lehet az ép vastagbéliszövet szabályozó folyamataiban. Megfigyeléseink alapján feltételezhető, hogy a SEPT9 gén az embriogenezisben és az onkogenezisben egyaránt szerepet játszik.

5.3. A SEPT9 gén metilációjának hatása az mRNS és fehérje szintre

A biopsziás mintákon és a lézer mikrodisszektált sejteken végzett mRNS expressziós kísérleteink eredményei nagyrészt összhangban vannak a szöveti DNS metilációs vizsgálatokban tapasztalt megfigyeléseinkkel. Az egészséges, adenomás és tumoros mintákban szignifikánsan eltérő SEPT9 mRNS expressziót mutattunk ki a betegség progressziójának megfelelően, azonban a SEPT9 különböző transzkriptumai esetében az expressziós értékek változása egymástól eltérő tendenciát mutatott.

Az ép mintákban a SEPT9 gén 207425_s_at transzkriptumának vizsgálata során meglepő módon alacsony mRNS expressziót igazoltunk, szemben a 1559025_at transzkriptum magasabb mRNS szintjével. A két transzkriptum expressziója között a másik feltűnő különbséget az adenomás mintákban igazoltuk. A 207425_s_at transzkriptum az enyhén diszplasztikus adenomás mintákban a súlyosan diszplasztikus adenomákéhoz hasonló expressziós szintet mutatott, míg a 1559025_at transzkriptum esetében az egészséges mintákéhoz hasonló kifejeződést észleltünk. A DNS metilációs vizsgálatok eredményeivel inkább a 1559025_at transzkriptum expressziós változása hozható összefüggésbe, ezért a lézer mikrodisszekált mintákon végzett vizsgálatainkban ezt a transzkriptumot vizsgáltuk.

Az mRNS expressziós eltérések és az ennek háttérében potenciálisan álló DNS metilációs változások eredetének igazolása céljából, lézer mikrodisszekciót követően lehetőségünk nyílt a stroma és hámsejtek SEPT9 mRNS expressziós szintjét külön-külön megvizsgálni. Érdekes módon eltérő SEPT9 mRNS expressziós szinteket észleltünk a két mintacsoport között.

A stromabeli expresszió vizsgálatokor az ép és az adenoma mintákban azonos SEPT9 mRNS kifejeződést tapasztaltunk, míg az ép hámban szignifikánsan magasabb SEPT9 mRNS expressziót észleltünk, mint az adenomás hámban ($p < 0,05$). A biopsziás vizsgálatok során mindkét sejttípus (a hám és a stroma egyaránt) jelen volt, ez magyarázhatja az ép mintákban detekált eltérő expressziós értékeket.

A fenti megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a SEPT9 mRNS expressziós változások döntő része a hámszövetből származik. Ezt a fehérje expressziós vizsgálataink eredményei is alátámasztották. Immunhisztokémiai kísérleteink során az ép mintáknál leginkább a luminális epitéliumban észleltünk SEPT9 fehérje expressziót, míg az adenomákban főleg a hámsejtek apikális citoplazmájában. A betegség progressziója során egyre gyengébb SEPT9 fehérje termelődést tapasztaltunk immunhisztokémiai módszerrel. A tumoros állapotot jellemző magas SEPT9 hipermetiláció epiteliális eredetét más tanulmányunk is igazolta [156]. A hámsejtekben a metiláció már a tumorhoz közeli (szövettanilag egészséges szövet a tumortól 1 cm távolságra) sejtcsoportokon is jelentkezik.

Feltételezésünket, hogy a SEPT9 expresszió csökkenését DNS metiláció okozhatja, az immunhisztokémiai és a DNS metilációs vizsgálataink között észlelt inverz korreláció is alátámasztja. Az egészséges mintákban tapasztalt magas SEPT9 fehérje expressziós szint korrelált az alacsony SEPT9 metilációs szinttel. Ugyanez az összefüggést tapasztaltuk az adenomás és a tumoros minták esetén is. A két különböző molekuláris szinten történt megfigyelés egyaránt erősíti azt a hipotézist, hogy a colon szövetben létrejövő kritikus molekuláris változások már rákmegelőző állapotban is megjelennek, nemcsak a tumorban.

5.4. A SEPT9 splice variánsok vizsgálata

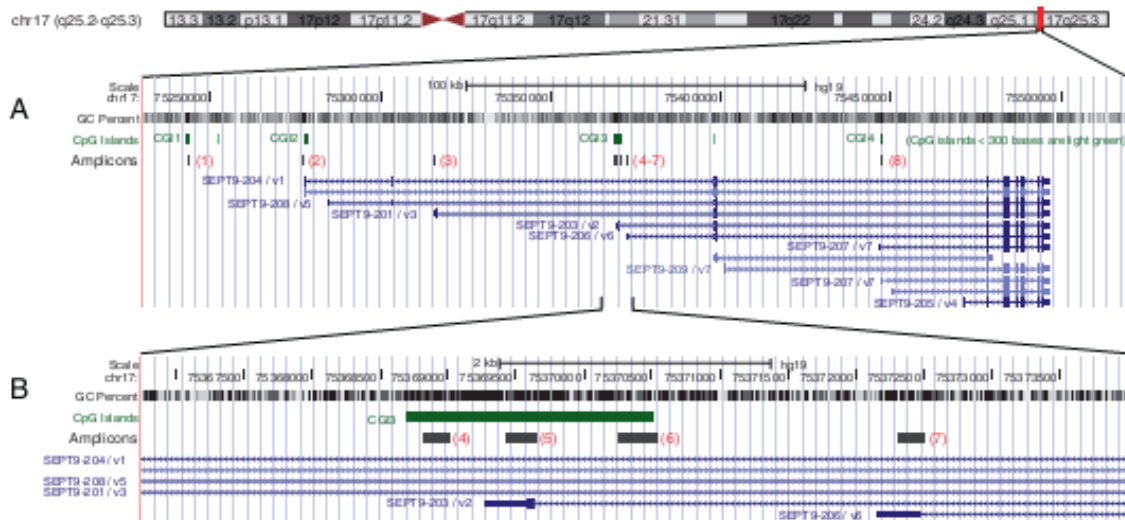
A Septin 9 mRNS splice variánsok expressziójának elemzését számos tanulmány összefoglalta már. A SEPT9_v1 transzkriptum emelkedett expresszióját emlő, petefészek és prosztata tumorokban mutatták ki, míg ezek közül egyik szerv normális szövetében sem volt kimutatható [131, 133]. A fenti irodalmi adatokkal ellentétben, vizsgálatainkban egyedül a SEPT9_v1 transzkriptum variáns esetén észleltünk a normális colonban magasabb expressziót, mint a tumorszövetben, ami összhangban van a biopsziás mintákban kapott SEPT9 mRNS és fehérje expressziós eredményeinkkel és a tumorban fokozódó DNS metilációval.

Az emlő tumorokban normális szövethez képest a legnagyobb expressziós eltérést a SEPT9_v1, a SEPT9_v3, a SEPT9_v6 és a SEPT9_v7 transzkriptumok variánsok esetén írták le. Az előzőeknél kisebb mértékű, de szignifikáns különbséget mutattak ki a SEPT9_v2 és a SEPT9_v5 variánsok expressziójában, míg a SEPT9_v4 izoforma expressziója nem változott [109]. A fenti tanulmányok és saját eredményeink közötti ellentmondás egyik magyarázata az lehet, hogy a különböző transzkriptum variánsok expresszióját más-más CpG szigeteken bekövetkező DNS metiláció befolyásolhatja, ami az egyes szövettípusokban eltérően jelentkezik [156].

A SEPT9 DNS metiláció és az általa befolyásolt mRNS expresszió korábban már említett hám eredetét több SEPT9 splice variáns tanulmány is megerősíti. A SEPT9_v1 és a SEPT9_v4* transzkriptumok magas expressziós szintjét petefészek tumorok hámsejtjeiben is leírták [133], míg a SEPT9_v4 kivételével az összes izoforma fokozott expresszióját emlő tumorok hámsejtjeiben mutatták ki [109].

A SEPT9_v2, a SEPT9_v4, a SEPT9_v4* és a SEPT9_v5 splice variánsok fokozott expresszióját tapasztaltuk a vastagbél tumoros mintákban a normális mintacsoporthoz képest. Ezt az összefüggést a biopsziás elemzésnél egyedül a 207425_s_at azonosítójú transzkriptum esetében figyeltük meg. Az irodalmi adatokkal ellentétben, vizsgálatunkban a SEPT9_v2, a SEPT9_v4 és a SEPT9_v5 transzkriptumok esetében is észleltünk eltérést a normális és a tumoros minták között, bár nagymértékű különbséget csak a SEPT9_v2 és a SEPT9_v4* esetében mutattunk ki [133]. A SEPT9_v2 transzkriptum expressziójában észlelt eltérést más tanulmányok is alátámasztják [139, 156]. A SEPT9_v2 transzkriptum startpontja a SEPT9 gén legnagyobb CpG szigetének megfelelő génszakaszra esik (16. ábra).

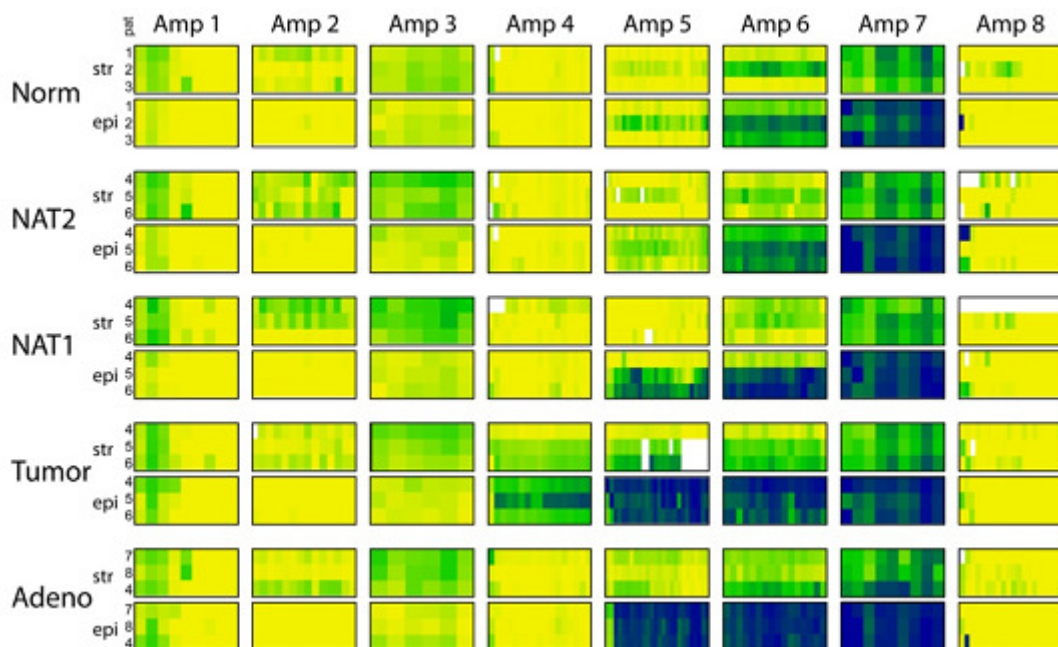
A DNS metilációs kísérletekhez felhasznált Epi proColon kit is ezen CpG sziget adott szakaszának metilációs állapotát méri, amelynek metiláltsága vastagbélrákra leginkább jellemző. Az említett CpG szigeten helyezkedik el az ábrán is látható 4., 5. és 6. amplicon is, amelyek direkt biszulfit szekvenálásával vizsgálták a SEPT9 gén metiláltságát ép, tumor melletti ép, adenoma és tumoros hám, illetve stroma mintákon. [156].



16. ábra. A SEPT9 gén genomiális felépítése [156]

Egészséges, adenomás, tumoros és tumor melletti, szövettanilag egészséges szöveteket (NAT2 = 10 cm-re a tumortól; NAT1 = 1 cm-re a tumortól) összehasonlítva, az 5. amplikonban mutatható ki a legnagyobb DNS metilációs különbség a mintacsoportok között. A tumorhoz közelebb eső területek hámsajtjein már megjelenik a DNS metiláció, ami az adenomákban és a tumorokban a legmagasabb (17. ábra) [156].

Az szekvenciálisan átfedő szakaszok tekintetében a SEPT9_v2 transzkriptumhoz az 5. amplikon áll a legközelebb. A fentiekkel összhangban a SEPT9_v2 transzkriptum esetében mutatható ki leginkább különbség a vizsgált mintacsoportok között.



17. ábra. A biszulfit konvertált DNS szekvenálási eredménye [156]

Amp = amplikon; Norm = normális szövet; NAT2 = szövettanilag egészséges szövet a tumortól 10 cm-re; NAT1 = szövettanilag egészséges szövet a tumortól 1 cm-re; Adeno = adenoma; str = stroma sejtek; epi = hámsajtjelek

Szín jelölések: sárga: metilálatlan (0%), zöld: részlegesen metilált (50%), kék: teljesen metilált (100%)

5.5. A SEPT9 metiláció és a szabad DNS szint közti összefüggés

A vérben keringő szabad DNS mennyisége és minősége a benignus és malignus állapotok egy lehetséges non-invazív biomarkere lehet, korábbi tanulmányok szerint ugyanis támogatja a diagnózis felállítását, továbbá előrejelezhető vele a tumoros progresszió és a kezelés hatékonysága [86-88]. Mead és mtsai [157] egészséges, adenomás és tumoros páciensek plazma mintáiból határozták meg a keringő szabad DNS szintet, és szignifikáns különbséget ($p \leq 0,001$) tapasztaltak mindhárom mintacsoport összehasonlításakor. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a szabad DNS szint meghatározása nemcsak a tumoros, hanem már a rákelőző adenoma állapot felismerésére is alkalmas.

PhD munkám során a perifériás vér SEPT9 metilációs szintjének vizsgálata mellett megmértem a vérben keringő szabad DNS mennyiséget is.

Emelkedett szabad DNS szintet mértünk az adenomás és a tumoros betegcsoportokban, azonban szignifikáns különbséget csak a normális és a tumoros minták között igazoltunk. A daganatos mintákat stádiumok szerint is megvizsgáltuk és a tumor stádium progresszióval párhuzamosan emelkedő tendenciát észleltünk. Lényegesen magasabb cfDNS mennyiséget azonban csak a IV. stádiumban tapasztaltunk, bár a tumoros mintacsoportban a szabad DNS koncentráció szórása igen nagyra bizonyult. Danese és mtsai hasonlóan széles koncentráció tartományt figyeltek meg [158]. Tanulmányukban szintén a szabad DNS mennyiséget és DNS metilációs szintet hasonlították össze vastagbél tumoros mintákban, és eredményeinkhez hasonlóan az abszolút szabad DNS koncentráció tumorstádiummal párhuzamos növekedését figyelték meg. A fenti kutatócsoport azonban már a korai stádiumokban (I. és II. stádium) is észlelt magas metilációs szintet, míg kutatócsoportunk a legmagasabb SEPT9 metilációt csupán a IV. stádiumban mérte. Kézenfekvőnek tűnik a magyarázat, hogy a késői, áttétes daganatban fokozódó cfDNS szint a tumor méretével, következésképpen a megnövekedett sejthalálózással és magas sejtproliferációval áll összefüggésben [159].

5.6. A SEPT9 gén mint CRC biomarker

A SEPT9 gént onkogénként és tumor szuppresszor géneként egyaránt leírták [160]. Proto-onkogén viselkedését egerekben T-sejt lymphoma kialakulása során figyelték meg [161]. Promóter régiójának hipermetiláltsága a génexpresszió csökkentésén keresztül azonban tumor szuppresszor funkciójára utal vastagbél [136-139], petefészek [162] és fej-nyaki tumorok esetén [163].

Vastagbél tumorokban a SEPT9-en kívül más gének - mint a protokadherin 10 (PCDH10; 55,5%), a szekretált frizzled-rokon fehérje 5 (SFRP5; 52,1%), a runt-rokon transzkripciós faktor 3 (RUNX3; 58,9%) vagy az inzulinszerű növekedési faktor 2 (IGF2; 50,4%) [164] - promóter régiójának hipermetilációját is leírták már, de egyik érzékenysége sem bizonyult elégségesnek ahhoz, hogy szűrésre alkalmazhatóak legyenek. Ennek magyarázata, hogy fokozott metilációjukat más tumorokban is kimutatták, így specificitásuk a vastagbélrákra gyenge. A PCDH10 promóter régiójának metilációját húgyhólyag tumorokban (50,4%) [165], méhnyakrákban (91%) [166] és gyomor daganatszövetben (86%) [167] is megfigyelték.

Vizsgálatunkhoz hasonlóan, szövetben és perifériás vérben a PCDH10 [158] és a Syndecan 2 (SDC2) metilációs szintjét [168] több tanulmányban is vizsgálták. A tumoros szövetminták mindkét mintacsoportban magas metilációs értéket mutattak (94%; 97,8%), azonban a SDC2 gén metilációjának szérumból történő kimutatása ígéretesebbnek bizonyult (87%), mint a PCDH10-é (62,7%).

A SEPT9 gént, mint a vastagbél-tumor kimutatására alkalmas markert, több korábbi tanulmány is ismertette [138-144; 169-172]. Fokozott SEPT9 metilációt írtak le az egészséges plazmaminták 9%-ában és a tumoros minták 73%-ában. Ezekhez a vizsgálatokhoz azonban egy korábbi módszert, az első generációs mSEPT9 kimutatási kitet (Epi proColon 1.0) használták. Saját vizsgálatainkhoz a második generációs módszert, az Epi proColon 2.0-t alkalmaztuk, amelynek előnye, hogy kevesebb reagens alkalmazásával, rövidített protokollal rövidebb idő alatt, egyszerre több minta vizsgálatát teszi lehetővé.

A módszer hatékonyságának megállapítására két különböző elemzési módot használtunk: a magasabb szenzitivitással járó 1/3 elemzést és a magasabb specificitású 2/3 analízist.

A korábban már alkalmazott [140] 1/3 módszer szerint a tumoros minták csupán 4,3%-ában (4/92) nem észleltünk SEPT9 hipermetilációt. Az egészséges minták 15,2%-ában (14/92) tapasztaltunk fokozott SEPT9 metilációt. A teszt érzékenysége az 1/3 módszerrel 95,6%-osnak, specificitása 84,8%-osnak bizonyult. A tumoros minták esetében összehasonlítottuk az érzékenységet a tumor lokalizációjának szempontjából is (jobb, illetve bal oldali elhelyezkedés) és nem találtunk eltérést (14. táblázat). Warren és mtsai [142] szintén elemezték a SEPT9 gén metiláltságát a tumor elhelyezkedése szerint. A tumorok 10%-a, amelyekben a SEPT9 gén nem bizonyult metiláltnak, nem mutatott lokalizáció preferenciát, bal-és jobb oldali tumorok egyaránt voltak köztük.

A saját vizsgálatunkban tapasztalt szenzitivitás értéket az irodalomban leírtakkal összehasonlítva [139-142; 169-173], kiemelkedő eredményt kaptunk (17. táblázat). Az 1/3 elemzési módszert követve a legalacsonyabb, 48,2%-os szenzitivitást Church és mtsai [170] munkája mutatta. A specificitás terén viszont hasonlóak voltak eredményeink (84,8%) más kutatások értékeivel (78,8%-91,5%) (17. táblázat).

A szenzitivitásban észlelt különbségekért valószínűleg az eltérő labortechnikai módszerek alkalmazása és a különböző mintavételi eljárások lehetnek a felelősek. Ahogy azt a 5.5. fejezetben ismertettem, az eredményt a szabad DNS mennyisége is befolyásolhatja, amely a mintavétel időpontjától is függhet. Korabecna és mtsai [174] tanulmányában egészséges páciensek mintáinak szabad DNS szintjét több időpontban mérték meg 24 óra alatt és a legmagasabb szintet a déli órákban észlelték, de délelőtti és délutáni maximális DNS szintek is előfordultak. A fentiek figyelembevételével a mSEPT9 marker érzékenysége úgy növelhető, hogy ha egységesen, lehetőleg a déli órákban történik a vérminták gyűjtése.

A 2/3 elemzési módszer alkalmazásával igen magas, 98,9%-os specificitást tapasztaltunk. Az egészséges minták csupán 1%-a (1/92) mutatott mSEPT9 pozitivitást, tehát ez a módszer alkalmasabb a normális minták elkülönítésére. A 2/3 elemzési szabályt követve, a tumoros minták csupán 79,3%-ában észleltünk SEPT9 hipermetilációt, de az irodalmi adatokkal összehasonlítva még így is kimagasló eredményt értünk el ezzel az elemzési móddal (17. táblázat).

A 2/3 elemzés további hátrányát a tumor lokalizációjának összehasonlítása során észleltük, ugyanis ezzel a módszerrel a jobb oldali tumorok kisebb százalékban (69,4%) mutathatók ki, mint a bal oldaliak (85,7%). Mindezeket összevetve szűrés szempontjából az 1/3 módszer bizonyult alkalmasabbnak.

17. táblázat. A mSEPT9 marker érzékenysége és fajlagossága vastagbél daganatokra az irodalmi adatok alapján

	Elemzési módszer	Szenzitivitás (%)	Specifititás (%)
Grützmann és mtsai 2008 [139]	2/3 ^a	48	93
	2/3 ^b	72	90
deVos és mtsai 2009 [140]	1/3 ^a	75	87
	2/3 ^a	57	98
	1/3 ^b	72	86
	2/3 ^b	56	95
Tanzer és mtsai 2010 [141]	1/3	82	88
	2/3	73	91
Warren és mtsai 2011 [142]	1/3	88,3	90
Tóth és mtsai 2012 [169]	1/3	95,6	84,8
	2/3	79,3	98,9
Church és mtsai 2014 [170]	1/3	48,2	91,5
Johnson és mtsai 2014 [171]	2/3	72,2	80,8
Potter és mtsai 2014 [172]	1/3	68	78,8
Jin és mtsai 2014 [173]	2/3	74,8	87,4

^a Beállítási vizsgálat

^b Megerősítési vizsgálat

Minden daganat szűrésénél cél, hogy minél korábbi stádiumban mutassuk ki az eltérést, ezért megvizsgáltuk a módszer hatékonyságát a vastagbél tumorok stádium szerinti lebontásában is. Az 1/3 analízis alkalmazásával a II. stádiumtól kezdve 100%-os biztonsággal meg lehet állapítani a tumor jelenlétét. Az I. stádiumú tumorok 84%-ában bizonyult megbízható markernek a SEPT9 metiláció. A 2/3 elemzést követve érdekes módon a II. stádiumban kaptuk a legjobb kimutatási eredményt (92,8%), majd a progresszióval párhuzamosan gyengébb érzékenységet észleltünk.

A legalacsonyabb érzékenységi szintet (60%) az I. stádiumú daganatoknál kaptuk, így ez az elemzés nem alkalmazható a korai (I.) stádiumú tumorok szűrésére. Más tanulmányok eredményeit is figyelembe véve megállapítható, hogy az 1/3 elemzési módszer követendő, a korai stádiumban való kimutatás és a szűrés érdekében (18. táblázat). Azonban az azonos kiértékelési módszerek között is nagy különbségek figyelhetők meg.

Church és mtsai [170] vizsgálatai szerint nemcsak az I., hanem a II. és a III. stádiumú tumoroknak is igen alacsony a kimutathatósága. Tanulmányukban részletezik, hogy a szenzitivitás és specificitás nagyobb a fiatalabb korosztályban (65 év alattiakban) és az érzékenység magasabb nőkben, mint férfiakban. Az eredményeket tehát a vizsgált populáció összetétele is befolyásolhatja.

18. táblázat. A mSEPT9 biomarker érzékenysége a vastagbél tumorok különböző stádiumaira

	Elemzési módszer	I. stádium (%)	II. stádium (%)	III. stádium (%)	IV. stádium (%)	Összes CRC (%)
Grützmann és mtsai 2008 [139]	2/3 ^a	43	44	54	55	48
	2/3 ^b	50	69	79	91	72
deVos és mtsai 2009 [140]	1/3 ^a	45	84	82	100	75
	2/3 ^a	32	66	59	100	57
	1/3 ^b	53	75	78	100	72
	2/3 ^b	26	60	67	75	56
Warren és mtsai 2011 [142]	1/3	71	90	100	100	90
Tóth és mtsai 2012 [169]	1/3	84	100	100	100	95,6
	2/3	60	92,8	88,6	77,8	79,3
Church és mtsai 2013 [170]	1/3	35	63	46	77,4	48,2
Johnson és mtsai 2014 [171]	2/3	61,5	80	65,2	92,3	73,3
Potter és mtsai 2014 [172]	1/3		64		100	68
Jin és mtsai 2014 [173]	2/3	66,7	82,6	84,1	100	74,8

^a Beállítási vizsgálat^b Megerősítési vizsgálat

Napjainkban igen nagy az érdeklődés és egyre több tanulmány jelenik meg a rákmegelőző állapotok, az adenomák szűrésének fontosságáról. Munkánk során megvizsgáltuk a mSEPT9 marker érzékenységét a rákelőző adenoma állapotra.

A korábban már részletezett plazmavizsgálatainkban a minták 30,8%-ában észleltünk SEPT9 metilációt a nagy rizikójú (1 cm-nél nagyobb, vagy villosus komponens tartalmazó) adenomás csoport esetében. Korábbi tanulmányok eredményeivel összehasonlítva ez az érték igen magas, mivel az adenoma kimutatási sikeresség 11-46%-os intervallumban mozog (19. táblázat).

A fenti megfigyelésünk alátámasztja az eddigi mRNS és fehérjeszintű eredményeinket is, miszerint az adenomás minták SEPT9 expressziója a normális és tumoros csoportokban tapasztalt értékek között mérhető. A mSEPT9 tehát nem megfelelő biomarkere az adenomáknak, de a korai stádiumú tumorokra már alkalmazható.

19. táblázat. A mSEPT9 marker érzékenysége adenomákra

	Elemzési módszer	≥10 mm (%)	< 10 mm (%)
Grützmann és mtsai 2008 [139]	2/3 ^a	22	9
	2/3 ^b	18	9
Tanzer és mtsai 2010 [141]	1/3	46	29
	2/3	-	-
Warren és mtsai 2011 [142]	1/3	11,8	9
Tóth és mtsai 2014 [175]	-	30,8	-
Church és mtsai 2014 [170]	1/3	11,2	-
Potter és mtsai 2014 [172]	1/3	22	20
Jin és mtsai 2014 [173]	2/3	27,4	-

^a Beállítási vizsgálat

^b Megerősítési vizsgálat

5.7. A mSEPT9 kimutatási módszer hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel

Munkánk során a mSEPT9 marker érzékenységét és fajlagosságát összehasonlítottuk a guajak-alapú FOBT-vel és a CEA szérumszintjével. A retrospektíven gyűjtött adatok szerint a legalacsonyabb szenzitivitást a gFOBT módszer adta (68,2%), és érzékenysége sem volt kielégítő (70,6%).

A gFOBT alacsony érzékenységét valószínűleg a nem specifikus gasztrointesztinális vérzések (mint pl. az aranyeres vérzések) magyarázhatják. Az egészséges egyének 29,4%-ában észleltünk vért a székletben, bár vizsgálatunkban a széklet vértesz elvégzése csak egy alkalommal történt, az ajánlott legalább két teszt elvégzése helyett.

A teszt elvégzését követő vastagbéltükrözés során azonban nem látták jelét sem tumornak, sem tumort megelőző állapotnak, így a normális csoportban észlelt gFOBT pozitivitás vagy felsőbb tápcsatornai vérzésre, esetleg aranyeres csomókra, helyi gyulladásra vagy diéta hibára utalhat.

A gFOBT és a mSEPT9 specificitása normális mintákra hasonlónak bizonyult: a gFOBT specificitása 70,6%-os, míg a mSEPT9 kimutatásé 76,5%-os volt. A tumoros minták tekintetében azonban számottevő eltérést észleltünk a specificitásban: a gFOBT esetében 68,2%-os, a mSEPT9-nél 100%-os értéket kaptunk. .

Egy másik tanulmány [171] a FIT szűrést hasonlította össze a SEPT9 metilációval és szintén 68%-os érzékenységet tapasztaltak a széklet tesztnél, de alacsonyabbat a mSEPT9 esetében (72,2%). A specificitás esetében sem mutattak ki a mi vizsgálatunktól való számottevő eltérést (mSEPT9: 80,8%; FIT: 97,4%).

A carcinoembrionális antigén (CEA) szintjének mérése korábbi eredmények [157] alapján sem alkalmazható szűrőműszerként, bár klinikai alkalmazása a tumorok követésére megfelelő. Munkánk során a gFOBT-hez hasonlóan a CEA eredményeket is összehasonlítottuk a SEPT9 metiláció hatékonyságával. Bár a szérum CEA szint nem ajánlott szűrésre, a specificitása viszonylag magas értéket, 85,2%-ot ért el, de az érzékenysége igen alacsonynak bizonyult (51,8%). Ha csak azokat a mintákat vesszük figyelembe, ahol a CEA és a mSEPT9 tesztet is elvégeztük, a CEA specificitása (85,2%) magasabb volt, mint a mSEPT9 markeré (70,4%). A mSEPT9 érzékenysége azonban magasabbnak bizonyult (100%).

A SEPT9 metiláció meghatározása azonban - a gFOBT és a CEA módszerekkel összehasonlítva - jelenleg drága. A mSEPT9 módszer egyelőre nincs automatizálva, manuális technikát igényel, így kevés mintaszámon lehet egyidőben a vizsgálatot elvégezni. A jövőben tervezett automatizációval azonban, az esetszám növelésével, kevesebb manuális beavatkozással a módszer költségei jelentősen csökkenthetők lennének.

5.8. Legfontosabb új megállapítások és megfigyelések

- A mSEPT9, mint perifériás vér alapú biomarker, már korábban is ismert volt, de a SEPT9 gén metilációs mintázatát vizsgálataimban hasonlítottam össze először ugyanazon páciensektől vett szöveti és vérmintákban. A normális mintacsoportnál alacsony, míg a tumorosnál magas metilációs szintet mutattam ki. A két különböző eredetű mintatípus között viszont az adenomás csoportban észleltem eltérést, ugyanis a szöveti mintákban magas, míg az adenomás plazmamintákban alacsony SEPT9 metilációt tapasztaltam.
- A mSEPT9 marker nem alkalmazható szűrőműszerként az adenomás mintákon perifériás vérből, azonban a biopsziás mintákban megbízhatóan jelzi az adenomák jelenlétét.
- Lézer mikrodisszekció segítségével elsőként mutattam ki, hogy a SEPT9 metiláció hám eredetű.
- Immunhisztokémiai vizsgálattal megerősítettem a SEPT9 DNS metilációnak a fehérje expresszióra gyakorolt hatását.
- A SEPT9 gén splice variánsainak (SEPT9_v1, _v2, _v4, _v4* és _v5) vizsgálatával kimutattam, hogy a SEPT9_v2 transzkriptum expressziója tér el leginkább a normális és tumoros minták között.
- A szabad DNS szint és a SEPT9 gén metilációja között korrelációt igazoltam tumoros mintákban, különösen a késői stádiumú vastagbél tumorokban.
- A mSEPT9 marker hatékonyságát összehasonlítva az eddig használt nem invazív módszerekével (mint a gFOBT-vel vagy az utánkövetésre használt CEA szintmeghatározással), a perifériás vérből történő mSEPT9 kimutatás hatékony módszernek bizonyult a vastagbél tumorok szűrésére

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a metilált SEPT9 gén a vastagbél-tumороk specifikus és szenzitív biomarkere szöveti és perifériás vérmintákban egyaránt. A tumороk szövet és plazmamintákból történő kimutatására egyaránt alkalmasnak bizonyult.

A módszer daganat megelőző állapotok szűrésére csak szöveti szinten alkalmazható. A daganatok szűrésére már a korai stádiumokban is használható a megfelelő elemzési módszert alkalmazva. A mSEPT9 marker kimutatása a perifériás vérből is elvégezhető, ezáltal komoly társadalmi hatásai lehetnek a vastagbél-tumороk szűrése terén a kedvező compliance miatt. A betegek részvételi aránya ugyanis az eddig használt leghatékonyabb módszer, a vastagbél-tükrözés esetében igen alacsony. Fontos azonban megjegyezni, hogy a mSEPT9 marker vizsgálata nem helyettesíti a vastagbél-tükrözést, de használatával csökkenteni lehetne a feleslegesen elvégzett, invazív vizsgálatok számát. Napjainkban ugyanis az egyre növekvő vastagbél-tumորos esetszám, egyre több vastagbél-tükrözést, ezzel együtt egyre több, a tükrözéshez értő szakembert, és műszert igényel. A perifériás vérből történő szűréssel így csak azokat a pácienseket kellene a tükrözésnek alávetni, akiknél a teszt pozitív, ezáltal nem csupán időt, energiát, hanem költségeket is megtakaríthatnánk. A mSEPT9 kimutatási módszerrel egy alternatív szűrés-i módszert ajánlhatnánk a pácienseknek, így növelve a szűrések compliance-ét.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

7.1. Összefoglalás - magyar

A vastagbél daganatok többsége kezelhető lenne, ha időben felfedezésre kerülnének, ennek ellenére még mindig sok beteget előrehaladott stádiumú betegséggel diagnosztizálnak, amikor a túlélési esély sokkal alacsonyabb. Ennek okai a jelenleg használt szűrőmódszerek korlátai, mint a nagy invazivitás és ezzel az alacsony beteg compliance vagy az alkalmazott módszerek alacsony érzékenysége és fajlagossága. Mindezek hangsúlyozzák az olyan biomarkerek fontosságát, amelyek kimutatása a perifériás vérből is lehetséges és megfelelő biztonsággal használhatók a vastagbél daganatok szűrésére. A megfelelő szűrőmarkerek azonosítását elősegíti a tumorok molekuláris hátterének, így a gyakori patogenetikai okként szereplő DNS metilációnak a vizsgálata. PhD munkámban a vastagbél daganatokra specifikus marker, a Septin 9 gén metilációs mintázatát, valamint mRNS és fehérje expresszióját vizsgáltam az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során. Megállapítottam, hogy a SEPT9 gén metilációja vastagbél daganatokban szöveti és plazmaszinten is kimutatható, a rákmegelőző adenomás mintákban azonban csak a szöveti mintákban mérhető biztonságosan. A SEPT9 gén DNS metilációs szintjének vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia során észlelt emelkedése állhat a csökkenő SEPT9 mRNS és fehérjeszint a hátterében, különösen a hámsejtekben. Megállapítottam, hogy a mSEPT9 kimutatási módszer igen magas specificitása és érzékenysége miatt hatékonyabb szűrőmódszer, mint a guajak-alapú széklet vér teszt vagy a CEA szint meghatározása, még a nehezen kimutatható jobb oldali tumorok esetében is. Megállapítottam továbbá, hogy a SEPT9 gén metilációjának meghatározása perifériás vérből megfelelő módszer a vastagbél daganatok szűrésére, de az adenomák felismerésére nem alkalmazható.

7.2. Összefoglalás - angol

Despite the colorectal cancer can be curable in most of the cases if it is recognized at early stage, still many CRC patients are diagnosed with advanced-stage disease and show poor prognosis. The reasons are the limitations of the used screening methods, such as high invasivity with low patient compliance or the low sensitivity and specificity. Therefore new biomarkers are needed, which can detect colorectal cancer from peripheral blood and can be safely used as screening marker. The identification of the appropriate screening markers can be enhanced by studying the molecular background of the carcinogenesis such as DNA methylation as a frequent pathogenetic factor. In my PhD thesis, DNA methylation of Septin 9, a colorectal cancer sensitive biomarker was analysed during the colorectal adenoma-carcinoma sequence progression, furthermore SEPT9 mRNA and protein expression were also examined. I have established, that methylated SEPT9 was detected both in tissue and in plasma samples of CRC patients, furthermore it was manifested only in tissue samples from the precancerous adenomas. The increasing methylation of Septin 9 gene during the colorectal adenoma-carcinoma sequence progression is reflected in the decreasing SEPT9 mRNA and protein expression, especially in the epithelium. I have established, that the high sensitivity and specificity of mSEPT9 marker makes this non-invasive technique a better method for colorectal cancer detection than guajac-based fecal occult blood test or CEA level measurement, even for the more difficultly detectable right sided colon cancers. I have concluded that the detection of SEPT9 gene methylation from peripheral blood is a suitable screening method for colorectal cancer, but not for adenomas.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics, 61: 69-90.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49: 1374-1403.
3. Hagggar FA, Boushey RP. (2009) Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, 22: 191-197.
4. Boyle P, Langman JS. (2000) ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321: 805-808.
5. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/HealthProfessional/page3>
6. http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15%20MAy2011.pdf
7. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. Vastagbél- és végbélrák. (2005) *Egészségügyi Közlöny*, 12. szám
8. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. (2010) Colorectal cancer. *Lancet*, 375: 1030-1047.
9. Jenkinson F, Steele RJ. (2010) Colorectal cancer screening - methodology. *Surgeon*, 8: 164-171.
10. Tarpay Ádám, Szabadosné Németh Mária, Orosz Enikő, Kásler Miklós, Burai Mária, Pap Ákos, Ottó Szabolcs. (2011) Széklehemoglobin és -albumin kettős immunkémiai vizsgálat colorectalis szűrésnél. *Magyar Onkológia*, 55: 268–273.
11. Guruswamy S, Rao CV. (2008) Multi-Target Approaches in Colon Cancer Chemoprevention Based on Systems Biology of Tumor Cell-Signaling. *Gene Regul Syst Bio*, 2: 163-176.
12. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task

- Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. (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. *Gastroenterology*, 134: 1570-1595.
13. Herszényi L, Tulassay Zs. A vastagbélrák modern klinikai megítélése. In: Tulassay Zs (szerk.), *A vastagbélrák megelőzése és kezelése*. Springer, Budapest, 2004: 93-106.
 14. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, Pappas L, Boucher K, Provenzale D, Rowe KG, Mineau GP, Smith K, Pimentel R, Kirchoff AC, Burt RW. (2014) Characteristics of missed or interval colorectal cancer and patient survival: a population-based study. *Gastroenterology*, 146: 950-960.
 15. Rockey DC. (1999) Occult gastrointestinal bleeding. *N Engl J Med*, 341: 38-46.
 16. Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH. (1999) Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst*, 91: 434-437.
 17. Ahlquist DA, Shuber AP. (2002) Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta*, 315: 157-168.
 18. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, Tucker JP, Tekawa IS, Cuff T, Pauly MP, Shlager L, Palitz AM, Zhao WK, Schwartz JS, Ransohoff DF, Selby JV. (2007) Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 99: 1462– 1470.
 19. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Leshno M, Niv Y. (2007) A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*, 146: 244–255.
 20. Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Cretella M, Mannisi E, Sileri P, Formosa A, Pallone F, Federici G, Bernardini S. (2011) A simplified, non-invasive fecal-based DNA integrity assay and iFOBT for colorectal cancer detection. *Int J Colorectal Dis*, 26: 583-592.
 21. Ahlquist DA. (2010) Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 138: 2127-2139.

22. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME; Colorectal Cancer Study Group. (2004) Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med*, 351: 2704-2714.
23. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM. (2014) Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*, 370: 1287-1297.
24. Heigh RI, Yab TC, Taylor WR, Hussain FT, Smyrk TC, Mahoney DW, Domanico MJ, Berger BM, Lidgard GP, Ahlquist DA. (2014) Detection of colorectal serrated polyps by stool DNA testing: comparison with fecal immunochemical testing for occult blood (FIT). *PLoS One*, 9: e85659.
25. Elmunzer BJ, Hayward RA, Schoenfeld PS, Saini SD, Deshpande A, Waljee AK. (2012) Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med*, 9: e1001352.
26. Irvine EJ, O'Connor J, Frost RA, Shorvon P, Somers S, Stevenson GW, Hunt RH. (1988) Prospective comparison of double contrast barium enema plus flexible sigmoidoscopy v colonoscopy in rectal bleeding: barium enema v colonoscopy in rectal bleeding. *Gut*, 29: 1188-1193.
27. Roy HK, Gomes AJ, Ruderman S, Bianchi LK, Goldberg MJ, Stoyneva V, Rogers JD, Turzhitsky V, Kim Y, Yen E, Jameel M, Bogojevic A, Backman V. (2010) Optical measurement of rectal microvasculature as an adjunct to flexible sigmoidoscopy: gender-specific implications. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3: 844-851.
28. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. (2011) Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology*, 259: 393-405.
29. Pineau BC, Paskett ED, Chen GJ, Espeland MA, Phillips K, Han JP, Mikulaninec C, Vining DJ. (2003) Virtual colonoscopy using oral contrast compared with colonoscopy for the detection of patients with colorectal polyps. *Gastroenterology*, 125: 304-310.

30. Zijta FM, Bipat S, Stoker J. (2010) Magnetic resonance (MR) colonography in the detection of colorectal lesions: a systematic review of prospective studies. *Eur Radiol*, 20: 1031-1046.
31. Yasuda S, Fujii H, Nakahara T, Nishiumi N, Takahashi W, Ide M, Shohtsu A. (2001) ¹⁸F-FDG PET detection of colonic adenomas. *J Nucl Med*, 42: 989-992.
32. O'Connor OJ, McDermott S, Slattery J, Sahani D, Blake MA. (2011) The Use of PET-CT in the Assessment of Patients with Colorectal Carcinoma. *Int J Surg Oncol*, 2011: 846512.
33. Forde KA. (2006) Colonoscopic screening for colon cancer. *Surg Endosc, Suppl* 2: S471-474.
34. Gold P, Freedman SO. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, 122: 467-481.
35. Booth SN, King JP, Leonard JC, Dykes PW. (1973) Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. *Gut*, 14: 794-799.
36. Chen JS, Chen KT, Fan WC, Yu JS, Chang YS, Chan EC. (2010) Combined analysis of survivin autoantibody and carcinoembryonic antigen biomarkers for improved detection of colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med*, 48: 719-725.
37. Duffy MJ. (2001) Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem*, 47: 624-630.
38. Bagaria B, Sood S, Sharma R, Lalwani S. (2013) Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis). *Cancer Biol Med*, 10: 148-157.
39. Chen W, Liu Q, Tan SY, Jiang YH. (2013) Association between carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9 and body mass index in colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol*, 1: 879-886.
40. Kheirelseid EAH, Miller N, Kerin MJ. (2013) Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*, 3: 72-80.
41. Worthley DL, Leggett BA. (2010) Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev*, 31: 31-38.

42. Muto T, Bussey HJR, Morson BC (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36: 2251-2270.
43. Clark JC, Collan Y, Eide TJ, Estève J, Ewen S, Gibbs NM, Jensen OM, Koskela E, MacLennan R, Simpson JG. (1985) Prevalence of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, 36: 179-186.
44. Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
45. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. (1986) Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet*, 25: 473-476.
46. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319: 525-532.
47. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89: 845-860.
48. Bienz M, Clevers H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103: 311-320.
49. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Battle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ. (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, 18: 1385-1390.
50. Howe JR, Guillem JG. (1997) The genetics of colorectal cancer. *Surg Clin North Am*, 77: 175-195.
51. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. (2012) Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 27: 1423-1431.
52. Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli NJ. (2003) Molecular prognostics in colorectal cancer. *Surg Oncol*, 12: 173-186.
53. Ranaldi R, Gioacchini AM, Manzin A, Clementi M, Paolucci S, Bearzi I. (1995) Adenoma-carcinoma sequence of colorectum. Prevalence of K-ras gene

- mutation in adenomas with increasing degree of dysplasia and aneuploidy. *Diagn Mol Pathol*, 4: 198-202.
54. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. (1994) The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev*, 8: 1174-1183.
55. Caron de Fromentel C, Soussi T. (1992) TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 4: 1-15.
56. Adimoolam S, Ford JM. (2003) p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 2: 947-954.
57. Grady WM, Carethers JM. (2008) Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135: 1079-1099.
58. Hoeijmakers JH. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374.
59. Lynch HT, de la Chapelle A. (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*, 36: 801-818.
60. Lee S, Cho NY, Yoo EJ, Kim JH, Kang GH. (2008) CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancers: Comparison of the New and Classic CpG Island Methylator Phenotype Marker Panels. *Arch Pathol Lab Med*, 132: 1657-1665.
61. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*, 2011: 902674.
62. Jass JR. (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50: 113-130.
63. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. (2013) The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 62: 367-386.
64. Patai AV, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. (2013) Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 19: 607-615.
65. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8681-8686.

66. Siedlecki P, Zielenkiewicz P. (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol*, 53: 245-256.
67. Goel A, Boland CR. (2012) Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 143: 1442-1460.e1.
68. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247-257.
69. Bestor TH. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9: 2395-2402.
70. Baylin SB, Herman JG. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, 16: 168-174.
71. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61: 3225-3229.
72. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet*, 7: 536-540.
73. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*, 58: 5489-5494.
74. Issa JP. (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 32: 31-43.
75. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11: 6883-6894.
76. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300: 455.
77. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395: 89-93.
78. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. (2007) DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med*, 7: 85-102.
79. Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, Baylin SB. (1993) Increased cytosine DNA-

- methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst*, 85: 1235-1240.
80. Mandel P, Metais P. (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Acad Sci Paris*, 142: 241-243.
81. Tong YK, Lo YM. (2006) Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta*, 363: 187-196.
82. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. (1973) The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest*, 52: 198-204.
83. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. (1966) Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 45: 1732–1740.
84. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37: 646–650.
85. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23: 707-712.
86. Boni L, Cassinotti E, Canziani M, Dionigi G, Rovera F, Dionigi R. (2007) Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surg Oncol*, 16 Suppl 1: S29-31.
87. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, Beaune P, Cugnenc PH, Laurent-Puig P. (2002) Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer*, 100: 542-548.
88. Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. (2003) A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut*, 52: 101-108.
89. Philipp AB, Nagel D, Stieber P, Lamerz R, Thalhammer I, Herbst A, Kolligs FT. (2014) Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14: 245.

90. Anker P, Stroun M, Maurice PA. (1975) Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*, 35: 2375-2382.
91. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61: 1659-1665.
92. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 16368-16373.
93. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. (2007) Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res*, 635: 105-117.
94. Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. (2005) Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*, 65: 956-961.
95. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535.
96. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 15880-15885.
97. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, Scadden DT, Wagner DD. (2012) Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 13076-13081.
98. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Riccieri V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. (2011) Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*, 3: 73ra19.

99. Pisetsky DS, Gauley J, Ullal AJ. (2011) Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol Res*, 49: 227-234.
100. Steinman CR. (1975) Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*, 56: 512-515.
101. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. (2001) Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*, 41: 276-282.
102. Hartwell LH. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast (IV). Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res*, 69: 265–276.
103. Hall PA, Russell SE. (2004) The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol*, 204: 489-505.
104. Pan F, Malmberg RL, Momany M. (2007) Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol*, 7: 103.
105. Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. (2005) Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol*, 206: 269-278.
106. Peterson EA, Kalikin LM, Steels JD, Estey MP, Trimble WS, Petty EM. (2007) Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mamm Genome*, 18: 796-807.
107. Kartmann B, Roth D. (2001) Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, 114: 839-844.
108. Nagata K, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M. (2004) Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *J Biol Chem*, 279: 55895-55904.
109. Connolly D, Hoang HG, Adler E, Tazearslan C, Simmons N, Bernard VV, Castaldi M, Oktay MH, Montagna C. (2014) Septin 9 amplification and isoform-specific expression in peritumoral and tumor breast tissue. *Biol Chem*, 395: 157-167.
110. McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Johnston PG, Russell SE. (2001) Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene*, 20: 5930-5939.

111. McDade SS, Hall PA, Russell SE. (2007) Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease. *Hum Mol Genet*, 16: 742-752.
112. Methner A, Leyboldt F, Joost P, Lewerenz J. (2001) Human septin 3 on chromosome 22q13.2 is upregulated by neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 48–56.
113. Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kumar S, Noda M, Kimura J. (1998) Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 153: 1551–1560.
114. Kinoshita M. (2006) Diversity of septin scaffolds. *Curr. Opin. Cell Biol*, 18: 54–60.
115. Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT. (2002) Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *J Neurooncol*, 57: 169–177.
116. Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, Noda M, Kinoshita M. (2003) Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Biol Chem*, 278: 24095–24102.
117. Cheon MS, Fountoulakis M, Dierssen M, Ferreres JC, Lubec G. (2001) Expression profiles of proteins in fetal brain with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*, 61: 311–319.
118. Hannibal MC, Ruzzo EK, Miller LR, Betz B, Buchan JG, Knutzen DM, Barnett K, Landsverk ML, Brice A, LeGuern E, Bedford HM, Worrall BB, Lovitt S, Appel SH, Andermann E, Bird TD, Chance PF. (2009) SEPT9 gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology*, 72: 1755–1759.
119. Mostowy S, Nam Tham T, Danckaert A, Guadagnini S, Boisson-Dupuis S, Pizarro-Cerdá J, Cossart P. (2009) Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS One*, 4: e4196.
120. Cerveira N, Bizarro S, Teixeira MR. (2011) MLL-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies. *Biol Chem*, 392: 713-724.

121. Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR. (2006) SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene*, 25: 6147-6152.
122. Tatsumi K, Taki T, Taniwaki M, Nakamura H, Taguchi J, Chen YZ, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. (2001) The CDCREL1 gene fused to MLL in de novo acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q11.2) and its frequent expression in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 30: 230–235.
123. Ono R, Taki T, Taketani T, Kawaguchi H, Taniwaki M, Okamura T, Kawa K, Hanada R, Kobayashi M, Hayashi Y. (2002) SEPTIN6, a human homologue to mouse Septin6, is fused to MLL in infant acute myeloid leukemia with complex chromosomal abnormalities involving 11q23 and Xq24. *Cancer Res*, 62: 333–337.
124. Slater DJ, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Shah N, Meek RG, Williams WR, Lovett BD, Osheroff N, Autar RS, Ried T, Felix CA. (2002) MLL–SEPTIN6 fusion recurs in novel translocation of chromosomes 3, X, and 11 in infant acute myelomonocytic leukaemia and in t(X;11) in infant acute myeloid leukaemia, and MLL genomic breakpoint in complex MLL–SEPTIN6 rearrangement is a DNA topoisomerase II cleavage site. *Oncogene*, 21: 4706–4714.
125. Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. (1999) AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer Res*, 59: 4261–4265.
126. Stevens SJ, Meers LE, Albrechts JC, Mebis-Verhees K, Bos GM, Engelen JJ, Janssen JW. (2010) A translocation in acute lymphoblastic leukemia that cytogenetically mimics the recurrent MLL-AFF1 translocation and fuses SEPT11 to MLL. *Cancer Genet Cytogenet*, 201: 48-51.
127. Osaka, M., Rowley, J. D., Zeleznik-Le, N. J. (1999) MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6428–6433.
128. Montagna C, Lyu MS, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, 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: 2179–2187.
129. Russell SE, McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Petty EM, Kalikin LM, Church SW, McIlroy S, Harkin DP, Keilty GW, Cranston AN, Weissenbach J, Hickey I, Johnston PG. (2000) Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res*, 60: 4729–4734.
130. Kalikin LM, Sims HL, Petty EM. (2000) Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, 63: 165–172.
131. Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, Loffreda-Wren JL, Kalikin LM, Petty EM. (2007) High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer Res*, 67: 8554–8564.
132. Hall PA, Russell SE. (2012) Mammalian septins: dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization. *J Pathol*, 226: 287–299.
133. Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SE. (2006) Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer*, 118: 1325–1329.
134. Tanaka M, Tanaka T, Matsuzaki S, Seto Y, Matsuda T, Komori K, Itoh J, Kijima H, Tamai K, Shibayama M, Hashimoto Y, Nakazawa H, Toma H. (2003) Rapid and quantitative detection of human septin family Bradeion as a practical diagnostic method of colorectal and urologic cancers. *Med Sci Monit*, 9: 61–68.
135. Kim DS, Hubbard SL, Peraud A, Salhia B, Sakai K, Rutka JT. (2004) Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. *Neoplasia*, 6: 168–178.
136. Jia ZF, Huang Q, Kang CS, Yang WD, Wang GX, Yu SZ, Jiang H, Pu PY. (2010) Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *J Neurooncol*, 98: 329–340.

137. Bennett KL, Karpenko M, Lin M-T, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, Plinkert P, Herpel E, Smiraglia D, Plass C. (2008) Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 68: 4494–4499.
138. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*, 54: 414-423.
139. Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehle S, Stolz T, Model F, Roblick UJ, Bruch HP, Koch R, Liebenberg V, Devos T, Song X, Day RH, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. (2008) Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, 3: e3759.
140. deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grützmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. (2009) Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*, 55: 1337-1346.
141. Tänzer M, Balluff B, Distler J, Hale K, Leodolter A, Röcken C, Molnar B, Schmid R, Lofton-Day C, Schuster T, Ebert MP. (2010) Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One*, 5: e9061.
142. Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA. (2011) Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*, 9: 133.
143. 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: 575-585.
144. Molnár B, Tóth K, Barták BK, Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*, 15: 171-184.
145. Irizarry RA, Wu Z, Jaffee HA. (2006) Comparison of Affymetrix GeneChip expression measures. *Bioinformatics*, 22: 789-794.

146. Irizarry RA1, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31: e15.
147. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Murillo FM, Spencer F. (2004) A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association*, 99: 909-917.
148. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 5116-5121.
149. Benjamini Y, Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 57: 289–300.
150. R Development Core Team: R. (2011) A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0
151. Dolat L, Hu Q, Spiliotis ET. (2014) Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biol Chem*, 395: 123-141.
152. Mostowy S, Cossart P. (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 183-194.
153. Lassen LB, Füchtbauer A, Schmitz A, Sørensen AB, Pedersen FS, Füchtbauer EM. (2013) Septin9 is involved in T-cell development and CD8+ T-cell homeostasis. *Cell Tissue Res*, 352: 695-705.
154. Russell SE, Hall PA. (2005) Do septins have a role in cancer? *Br J Cancer*, 93: 499-503
155. Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, Zou H, Domanico M, Thibodeau SN, Boardman LA, Berger BM, Lidgard GP. (2012) The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10: 272-277.

156. Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, Toth K, Tulassay Z, Sledziewski AZ, Molnar B. (2013) Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer*, 13: 398.
157. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. (2011) Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Cancer*. 105: 239-245.
158. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Montagnana M, Paviati E, Salvagno GL, Gusella M, Pasini F, Guidi GC, Lippi G. (2013) Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma - the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 109: 807-813.
159. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61: 1659-1665.
160. Connolly D, Abdesselam I, Verdier-Pinard P, Montagna C. (2011) Septin roles in tumorigenesis. *Biol Chem*, 392: 725-738.
161. Sørensen AB, Warming S, Füchtbauer EM, Pedersen FS. (2002) Alternative splicing, expression, and gene structure of the septin-like putative proto-oncogene Sint1. *Gene*, 285: 79-89.
162. Burrows JF, Chanduloy S, McIlhatton MA, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin AK, Johnston PG, Russell SE. (2003) Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *J Pathol*, 201: 581-588.
163. Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, Plinkert P, Herpel E, Smiraglia D, Plass C. (2008) Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 68: 4494-4499.
164. Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV, DE Lima JM, Neto RA, Saad SS, Forones NM. (2013) DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*, (6): 1687-1692.
165. Lin YL, Li ZG, He ZK, Guan TY, Ma JG. (2012) Clinical and prognostic significance of protocadherin-

- 10 (PCDH10)promoter methylation in bladder cancer. *J Int Med Res*, 40: 2117-2123.
166. Narayan G, Scotto L, Neelakantan V, Kottoor SH, Wong AH, Loke SL, Mansukhani M, Pothuri B, Wright JD, Kaufmann AM, Schneider A, Arias-Pulido H, Tao Q, Murty VV. (2009) Protocadherin PCDH10, involved in tumor progression, is a frequent and early target of promoter hypermethylation in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 983-992.
167. Li Z, Chim JC, Yang M, Ye J, Wong BC, Qiao L. (2012) Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 298-305.
168. Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, Kim TS, Kim NK, Chung HC, An S. (2013) Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn*, 15: 498-507.
169. Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One*, 7: e46000.
170. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF; PRESEPT Clinical Study Steering Committee, Investigators and Study Team. (2014) Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 63: 317-325.
171. Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, Weiss G, König T, Beck J, Potter NT. (2014) Plasma Septin9 versus fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. *PLoS One*, 9: e98238.
172. Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, Koenig T, Quigley NB, Weiss G. (2014) Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin Chem*, 60: 1183-1191.

173. Jin P, Kang Q, Wang X, Yang L, Yu Y, Li N, He YQ, Han X, Hang J, Zhang J, Song L, Han Y, Sheng JQ. (2014) Performance of a second generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. *J Gastroenterol Hepatol*, 30: 830-833.
174. Korabecna M, Horinek A, Bila N, Opatrna S. Circadian Rhythmicity and Clearance of Cell-Free DNA in Human Plasma. In: Gahan PB (szerk.), *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*. Springer, London, 2011: 195-198.
175. Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) 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. *PLoS One*, 9: e115415.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) 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. *PLoS One*, 9: e115415. **IF: 3,234**

Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers. *PLoS One*, 7: e46000. **IF: 3,73**

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 17: 503-509. **IF: 1,366**

Molnár B, Tóth K, Barták BK, Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*, 15: 171-184. **IF: 3,516**

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

9.2. Disszertációtól független közlemények

Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*, 10: e0118332. **IF:3,234**

Bornschein J*, Tóth K*, Selgrad M, Kuester D, Wex T, Molnár B, Tulassay Z, Malfertheiner P. (2013) Dysregulation of CDX1, CDX2 and SOX2 in patients with gastric cancer also affects the non-malignant mucosa. *J Clin Pathol*, 66: 819-822. **IF: 2,551**

* társ első szerzők

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2013) Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. *PLoS One*, 8: e74140. **IF: 3,534**

Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One*, 7: e48547. **IF: 3,73**

Patai AV, Molnár B, Kalmár A, Schöller A, Tóth K, Tulassay Zs. (2012) Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis*, 30: 310-315. **IF: 2,725**

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z. (2012) Increase of α -SMA(+) and CK (+) Cells as an Early Sign of Epithelial-Mesenchymal Transition during Colorectal Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 18: 371-376. **IF: 1,555**

Sárvári M, Hrabovszky E, Kalló I, Solymosi N, Tóth K, Likó I, Széles J, Mahó S, Molnár B, Liposits Z. (2011) Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors α and β in the frontal cortex of middle-aged female rats. *J Neuroinflammation*, 8: 82. **IF: 3,827**

Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Muzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B. (2011) Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *Dis Markers*, 30: 1-17. **IF: 1,642**

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Muzes G, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathol Oncol Res*, 17: 11-16. **IF: 1,366**

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2011) Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *J Clin Pathol*, 64: 771-775. **IF: 2,306**

Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Zs, Molnár B. (2010) Reversal of gene expression pattern changes in the colorectal normal-adenoma but less in the normal-carcinoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br J Cancer*, 102: 765-773. **IF: 4,831**

Sárvári M, Kalló I, Hrabovszky E, Solymosi N, Tóth K, Likó I, Molnár B, Tihanyi K, Liposits Z. (2010) Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged, ovariectomized rats. *Endocrinology*, 151: 3847-3862. **IF: 4,993**

Sipos F, Múzes G, Valcz G, Galamb O, Tóth K, Leiszter K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2010) Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*, 45: 440-448. **IF: 1,966**

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*, 16: 541-545. **IF: 1,483**

Valcz G , Sipos F , Krenács T , Spisák S , Tóth K, Molnár B , Tulassay Zs. (2009) Az őssejtek jellemzése, mozgása és terápiás lehetőségei a humán vastagbélben. Magyar Belorvosi Archívum, 62: 272-278.

Galamb O, Sipos F, Solymosi N, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z, Molnár B. (2008) Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 17: 2835-2845. **IF: 4,770**

Tóth K, Galamb O, Solymosi N, Hevér-Pálfy T, Spisák S, Sipos F, Miheller P, Müllner K, Molnár B, Tulassay Zs. (2007) Vastagbél-betegségben szenvedők perifériás vérének mRNS expressziós vizsgálata. Magyar Belorvosi Archívum, 60: 531-539.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik segítettek PhD munkám elkészítését:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy irányítása mellett mindig megtaláltam a helyes utat eredményeim eléréséhez;
- Dr. Müllner Katalin és Dr. Nagy Géza házi opponenseimnek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért és hasznos tanácsaikért;
- Dr. Galamb Orsolyának és Dr. Spisák Sándornak, hogy szakmai tudásuk és támogatásuk segítségével beletekintést nyertem a molekuláris biológia világába és elsajátíthattam a helyes kutatói szemléletmódot;
- Dr. Sipos Ferencnek, hogy szakmai tapasztalatával mindig a segítségemre volt;
- Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségükért;
- Kalmár Alexandrának és Dr. Patai Árpádnak a laboratóriumi munkák kivitelezésében nyújtott segítségükért;
- Kónyáné Farkas Gabriella szakasszisztensnek az immunhisztokémiai munkákban nyújtott segítségért;
- Dr. Leiszter Katalinnak és Dr. Valcz Gábornak a támogatásukért és barátságukért;
- Berczik Máriának barátságáért és hogy minden helyzetben a legnagyobb segítséggel fordult felém;
- a Sejtanalitika Laboratórium összes munkatársának támogatásukért;
- a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópos Részlegének a mintagyűjtésben nyújtott segítségéért;
- és végül, de nem utolsó sorban Édesanyámnak, Férjemnek és Családomnak, hogy munkám végzése során a nehéz helyzetekben is mellettem álltak és megteremtették azt a biztos hátteret, amely mellett munkámat végezhettem.