Array vizsgálatok alkalmazása vastagbéldaganat specifikus biomarkerek azonosítása céljából

Doktori értekezés

Dr. Wichmann Barnabás

Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Füle Tibor, Ph.D., technikai szaktanácsadó Dr. Garami Miklós, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Ponyi Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A vastagbéltumorok előfordulása	7
2.2. A vastagbéldaganatok (CRC) genetikai változásai	8
2.2.1. Genetikai és epigenetikai változások	8
2.2.1.1. CIN útvonal	9
2.2.1.2. MSI útvonal	11
2.2.2. CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP) státusz	12
2.3. A vastagbélrák klinikai vonatkozásai	14
2.4. Biomarkerek	17
2.5. Microarray technika bemutatása	22
2.6. Array vizsgálatok marker szelekciókra	24
2.7. Microarray vizsgálatok vastagbélrákos mintákon	25
2.8. A mRNS microarray eredmények megerősítésére szolgáló módszerek	28
2.8.1. Valós idejű RT-PCR vizsgálatok	28
2.8.2. Fehérje expressziós vizsgálatok	29
3. CÉLKITŰZÉSEK	31
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	32
4.1. Beteg minták	32
4.1.1. Biopsziás minták	32
4.1.2. Vérminták	33
4.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok mintaanyaga	33
4.2. Módszerek	35
4.2.1. Mintaizolálás	35
4.2.2. Gén és fehérje-expressziós vizsgálati módszerek	37
4.2.2.1. Egycsatornás oligonukleotid microarray rendszer (Affymetrix)	38
4.2.2.2. Lézer mikrodisszekció	38
4.2.2.3. Független Gene Expression Omnibus adatbázis adatok	39
4.2.2.4. Valós idejű RT-PCR vizsgálatok	39
4.2.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok	42
4.3. A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai elemzések	44

5. EREDMÉNYEK	50
5.1. A marker sorozat azonosítása a "tréning" microarray sorozat mintáin	57
5.2. Markerek vizsgálata a "teszt" microarray mintasorozaton	
5.3. GEO adatbázis mintasorozatainak vizsgálata	59
5.4. Az markerek vizsgálata a független RT-PCR mintasorozaton	59
5.5. High-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrákos minták	
összehasonlítása	
5.6. A 11 potenciális biomarker változásai mintacsoportonként	
5.7. Fehérjeszintű validáció szövet microarray (TMA) rendszeren	
5.7.1. Fehérje expressziós vizsgálatok	
5.7.2. Az MMP3 és a CXCL1 fehérje expresszió adenomás és vastagbéltun	ioros
mintákban	86
5.8. A markersorozat elkülönítő képességének vizsgálata vérmintákon	
6. MEGBESZÉLÉS	
7. KÖVETKEZTETÉSEK	108
8. ÖSSZEFOGLALÁS	109
9. SUMMARY	110
10. IRODALOMJEGYZÉK	111
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	130
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	135
13. MELLÉKLETEK	136

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

 $ACTB - \beta$ -aktin

- ADCS Adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia
- APC Adenomatous polyposis coli
- BANK1 B-sejt komplexum fehérje ankirinnel 1. számú ismétlődés
- $BAT25-Mononukleotid\ mikroszatellita$
- BAT26 Mononukleotid mikroszatellita
- BAX Bcl-2 kapcsolódó X fehérje
- BCNP1 B-sejt fehérje 1
- BRAF B-Raf Proto-Oncogén Szerin/Treonin-Fehérje kináz
- $B2M \beta$ -2-mikroglobulin
- CA7 Karbon anhidráz VII
- CACNA1G Kálcium csatorna, feszültség függő, T-típus, alfa 1G alegység
- CCSA Vastagbélrák specifikus antigén
- CDA Citidin deamináz
- CDK4 Ciklin-függő 4-es kináz
- CEA Karcinoembrionális antigén
- CHI3L1 Kitináz 3-szerű 1-es fehérje
- CIMP CpG szigeteket érintő regionális hipermetiláció
- CIN Kromoszomális instabilitás
- COL12A1 XII típusú kollagén, α1

COX-2 – Ciklooxigenáz-2

- CpG-sziget GC gazdag szekvencia a promóter régió környékén
- CRC Vastagbél tumor
- CRMP-2 Collapsin válaszadó 2-es fehérje
- CXCL1-2 Kemokin (C-X-C motívum) 1, 2-es ligandum
- DCC Vastagbélrákban törlődött gén (Deleted in colon cancer)
- DcR3 Decoy 3-as receptor
- D5S346 Dinukleotid mikroszatellita
- D2S123 Dinukleotid mikroszatellita
- D17S250-Dinukleotid mikroszatellita
- FAP Familiáris adenomatosus polyposis

- **FDR** False Discovery Rate
- FIT Immunhisztokémiai székletvér teszt
- FOBT Guaiac alapú székletvér teszt
- FRET Fluoreszcens rezonancia energia transzfer
- GAPDH Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
- GEO Gene Expression Omnibus adatbázis
- GREM1 Gremlin 1
- HGD High-grade diszplázia
- HNP Humán neutrofil 1-es fehérje
- HNPCC Herediter nem-poliposis kolorektális karcinóma
- HPRT1 Hipoxantin foszforibozil transzferáz 1-es
- IGF2R Inzulin-szerű növekedési faktor 2-es receptor
- IL1B Interleukin 1 β
- IL1RN Interleukin 1 receptor antagonista
- IL8 Interleukin 8
- K-ras Kirsten patkány szarkóma vírusos onkogén homológ
- L-DNS d-konformációs DNS tükörkép
- Log₂FC a csoportok kettes alapú logaritmikus értékeinek átlag közötti különbségei
- LCM Lézer mikrodisszekció
- LOH Heterozigóta állapot elvesztése
- **LP** Lamina propria
- M-CSF Makrofág kolónia stimuláló faktor
- MGC20553 FRMD domén tartalmazó 3-as gén
- MIF Makrofág migrációt gátló faktor
- MLH1 mutL homológ 1
- MM Mismatch (nem tökéletesen illeszkedő) nukleinsavminta
- MMP3 Mátrix metalloproteináz 3
- MMR Téves egyezés javító géncsalád
- MS4A1 Membrane-Spanning 4-es domén, A alcsalád, 1-es tag
- MSI Microszatellita instabilitás
- MSI-L Alacsony szintű instabilitást
- MSH MutS fehérje homológ

- MSS Microszatellita stabilitás
- **M2-PK** Piruvát kináz M2
- **NEUROG1** Neurogenin 1
- NNMT Nikotinamid N-metiltransferáz
- PAM Predikciós microarray elemzés
- PCA Főkomponens-elemzés
- PM Perfect match (tökéletesen illeszkedő) nukleinsavminta
- PIDD P53-indukált halál domén fehérje
- PMS1, 2 Postmeiotic Segregation Increased 1, 2
- PSME3 Proteoszóm aktivátor komplex 3-as alegység
- PTEN Foszfatáz és tenzin homológ
- p16 Ciklin-függő kináz inhibitor 2A
- ROC Receiver Operating Characteristic
- RN18S1 RNS, 18S riboszóma 1, 18S riboszóma RNS
- **RPL13A** Riboszomális fehérje L13a
- **RT-PCR** Real-Time PCR
- RUNX3 Runt-related transzkripciós 3-as faktor
- SAM Significance microarray analízis
- SDHA Szukcinát dehidrogenáz komplex, A alegység, flavoprotein
- SLC7A5 Folyadék transzporter család 7, 5. tagja
- SMAD2-4 Mothers against decapentaplegic 2, 4-es homológ
- SOCS1 Citokin 1-es szignál szupresszor
- TGF-β Transzformálódó növekedési faktor (TGF)-β
- TGFβRII Transzformálódó növekedési faktor (TGF)-β receptor
- TCF4 Transzkripciós 4-es faktor
- TCF/LEF T-sejt faktor-1/limfoid erősítő 1-es faktor
- TMA Tissue microarray módszer
- TNM Daganat stádium beosztás
- UPL Egyetemes Próba Könyvtár (Universal Probe Library)

YWHAZ – Tirozin 3-monooxigenáz/triptofán 5-monooxigenáz aktivációs fehérje, ςpolipeptid

2. BEVEZETÉS

2.1. A vastagbéltumorok előfordulása

Napjainkra a vastagbéldaganatok diagnosztikája, terápiája és követése nagy fejlődésen ment át – sok esetben a nagy áteresztő képességű molekuláris technikáknak, mint például a microarray vizsgálatoknak köszönhetően – azonban még mindig nem tekinthető teljesen megoldottnak. A betegség gyakori előfordulása miatt további kutatások szükségesek, hogy a máig nem teljesen feltérképezett patogenetikai és molekuláris biológiai hátteret és eredetet tisztázzuk. A modern társadalmakban lényegesen nagyobb arányban fordulnak elő vastagbéldaganatos megbetegedések. A kolorektális rák (CRC) mindkét nemben a második leggyakoribb előfordulású rákos megbetegedés szemben a nem nyugati társadalmakkal (India, Thaiföld, Costa Rica) ahol csak a 4-8. leggyakoribb daganatos megbetegedés. Az Egészségügyi Világszervezet becslései alapján évente 1 361 000 új beteget diagnosztizálnak, és 694 000-en halnak meg a betegségben világszerte (Ferlay et al. 2012). A második leggyakoribb rákos betegség és halálok Európában is, 2012-ben megközelítőleg 447 000 új megbetegedést, valamint 215 000 halálesetet regisztráltak (Ferlay et al. 2013). A megbetegedések hazánkban is a mortalitás és morbiditás vezető okai közé tartoznak, a kolorektális rák mindkét nemben a második leggyakrabban halált okozó daganatos betegség, 2012-ben férfiaknál megközelítőleg 4 800, nőknél 3 700 új esetet regisztráltak, és megközelítőleg 2 600 férfi és 2 100 női halálesetet jegyeztek fel. Százezer főre vetítve, hazánkban férfiaknál 87, nőknél 45 a becsült előfordulási érték, amely a legmagasabbak értékek között van, a térség országaiban. Az ismertetett adatok tekintetében esszenciális feladat a daganat minél korábbi felismerése, amennyiben lehetséges még benignus állapotban, valamint amennyiben a tumor már kialakult, akkor a terápiás lehetőségek hatékonyságának növelése. Az 5 éves túlélési adatok alapján a korai rákoknál 63-92%, nyirokcsomó áttétek esetében 53-89%, metasztatikus, távoli szerveken áttétellel rendelkező tumoroknál azonban már csak 11% körüli az 5 éves túlélési arány (O'Connell et al. 2004, American Cancer Society 2014-15).

2.2. A vastagbéldaganatok genetikai változásai

A fejlődő tumor korai felismerése a betegek gyógyulása szempontjából kiemelten fontos. Napjainkban egyre bővül a vastagbélrák korai felismeréséhez elengedhetetlen molekuláris biológiai háttérinformáció, mely részben azoknak a nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai módszereknek köszönhető, amelyeket az elmúlt évtizedben fejlesztettek ki. Mai ismereteink szerint a CRC genetikai mutációk felhalmozódása mellett epigenetikai és génexpressziós változások következtében alakul ki. A mutációk kiváltója lehet környezeti karcinogén vagy örökletes génmutáció. A mutációk az adott gén működését befolyásolják. A kódolt fehérje szerkezete és mennyisége szabályozatlan sejtproliferációhoz vezethet, melynek következtében a sejt kivonja magát saját, illetve környezeti kontrollja alól. A hibás osztódási folyamat eredményeképpen létrejövő kóros szövetszaporulat akadályozza az érintett szövet vagy szerv optimális működést, valamint a daganat terjedése sok esetben nem korlátozódik csak az adott szövetre, szervre, hanem más szövetre, szervre is átterjedhet, ezáltal áttéteket képezhet. A vastagbélrákos megbetegedések döntő többsége (75-80%-a) a bal colon-félben jelenik meg, ám az utóbbi időben történt megfigyelések alapján, a jobb colon-félben történt detekciók egyre gyakoribbá válnak. A vastagbéltumorok genetikailag több csoportba sorolhatóak, melyek egységes előrejelzése alapvető jelentőséggel bírna a korai diagnosztika szempontjából.

A különböző leírások a beosztás tekintetében alapvetően három molekuláris csoportosítást követnek, melyek a genetikai instabilitás két formája, valamint a CpG sziget metilátor fenotípus megléte illetve hiánya (Szentirmay és Csuka 2004, Jass et al. 2007, Leggett et al. 2010, Wortley et al. 2014).

2.2.1. Genetikai és epigenetikai változások

Függetlenül az említett csoportosítástól, a tumor kialakulásához számos, egymást követő genetikai eltérésnek kell bekövetkeznie. A genetikai instabilitás lényeges elem, hiszen a későbbiek során bekövetkező változások bekövetkezésének esélyét növeli. Az instabilitás megléte nélkül, az új mutációk kialakulása lassabban történik meg, ezáltal a rákos elfajulás kialakulási ideje is eltolódik.

A vastagbélrák egy heterogén rákos megbetegedés mely kialakulása esetében genetikai változások során két instabilitási szintet ismerünk. A legdominánsabb (mely

az esetek akár 85%-ért is felelős) molekuláris kialakulási útvonal a kromoszómákat vagy azok részeit érintő kromoszomális instabilitás (CIN). A másik forma a genomban elszórtan elhelyezkedő mikroszatellita régiókat érintő instabilitás (MSI) (Jass et al. 2007, Wortley et al. 2014). A betegség kialakulása esetén a két genetikai instabilitás közül, egyszerre csak az egyik figyelhető meg, kizáró jelleggel (**1. ábra**).



1. ábra: A vastagbélrák kialakulásának lehetséges útjai (Fearon ER, Vogelstein B 1990)

2.2.1.1. CIN útvonal

A tumoros megbetegedések 70-85%-a (Grady et al. 2004, Wortley et al. 2014) a kromoszomális instabilitásra vezethető vissza, melyre jellemző a kromoszómaszámban, illetve a kromoszómastruktúrában bekövetkező változás. Jellemző a heterozigóta állapot elvesztése (LOH) a 18q, az 5q és 17p kromoszómákon történő deléció, illetve olyan kromoszómális eltérések, melyek a bekövetkező amplifikációk és transzlokációk következtében alakulnak ki. Aneuploidia, onkogének többszörös kromoszómális átrendeződése és szomatikus mutációik felhalmozódása jellemző. A csoport legismertebb kialakulása a familiáris adenomatosus polyposis (FAP), mely a daganatok 1%-át fedi le, s nagyszámú (100-at is meghaladható) adenoma megjelenése, valamint vékonybél polipok, desmoid tumorok, osteomák és csontciszták társulása jellemzi

(Rozen et al. 2006, Jass 2007). Az adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia (ADCS) modell (Vogelstein 1988, Fearon és Vogelstein 1990), a megbetegedések tekintetében leggyakoribb CIN forma kialakulását tekinti át. Az ADCS kialakulásra jellemző a sporadikusság, aneuploidia, poliploidia megléte, valamint a típusos adenoma alizaton történő kialakulás (Szentirmay és Csuka 2004, Jass et al. 2007, Wortley et al. 2014). A klasszikus modellel leírható kialakulás jellemzi őket, melynek során a jellemző APC, Kras és p53 mutációja következik be. BRAF mutáció nem vagy csak ritkán fordul elő bennük. A CIN útvonalon kialakuló tumorcsoportot azért tárgyaljuk részletesebben, mert vizsgálataink megkezdésekor a tumorok metilációs fenotípus, illetve mikroszatellita instabilitás meghatározására nem nyílt lehetőségünk. Mintáinkat hagyományos ADCS kialakulásúnak tekintjük. Az átlag populációban ~10-24%-ban benignus adenomák jelenléte figyelhető meg, melyek ~5%-a malignus tumorokká alakul a diszplázia különböző fokozatain keresztül (Leslie et al. 2002). Az ilyen jellegű átalakulás több évig (~10 év) tart (Nagy 2003). Környezeti mutagének, növekvő számú promóter metiláció hatására az ép vastagbél nyálkahártya hiperproliferatív nyálkahártyává alakul, amelyen további mutációk hatására (pl: APC) 1 cm-nél kisebb méretű tubuláris adenomák jöhetnek létre. Az APC mutációja a kolorektális karcinogenezis 75-80%-ra jellemző, mint legkorábbi molekuláris esemény (Takayama et al. 2001).

Az ADCS következő állomása, mikor az enyhén diszplasztikus adenomából közepes méretű (1-2 cm-es) tubulovillózus diszplasztikus adenoma alakul ki. Az átalakulás során fontos szerep jut K-ras onkogén mutációnak, mely a vastagbélrákok ~40-50%-ában fordul elő (Ranaldi et al. 1995, Span et al. 1996).

A következő lépcső, a tubulovillózus adenomából súlyos diszpláziát mutató adenoma (>2 cm) kialakulása. Fontos szerepet tulajdonítanak a 18. kromoszóma hosszú karján lévő gének allélvesztésének (DCC, SMAD2, SMAD4), mely a vastagbélrákok ~70%-ában jelenik meg (Hedrick et al. 1994, Bevan et al. 1999).

A folyamat végén a súlyosan diszplasztikus adenomából karcinóma alakul ki, melyet a p53 tumor szupresszor mutációja és inaktivációja segít elő (Lane 1992, May et al. 1999). A sejtproliferáció a funkcióvesztése következtében kontrollálatlanná válik. A p53 mutáció ~70%-os gyakoriságú az ADCS során és általában az invazív növekedési fázis előtt következik be (Mills et al. 2005).

10

2.2.1.2. MSI útvonal

A mikroszatelliták olyan változó hosszúságú (1-6), bázis-ismétlődő szekvenciák, melyek elszórtan helyezkednek el a genomban. Instabilitásról akkor beszélünk, amikor a mikroszatellita ismétlődések számában változás következik be. Ilyen például, amikor a DNS hibajavító enzimek funkciójának (mismatch repair, MMR) mutáció vagy metiláció következtében kialakult hibája révén, az ismétlődések hossza megváltozik, minek következtében a DNS replikáció és az azt követő rekombináció következtében keletkező hibás nukleotid-párok nem javítódnak ki. A csoportba tartozik a leggyakoribb (előfordulási gyakorisága ~3-5%) örökletes vastagbélrák típus, a herediter non-poliposis kolorektális karcinóma (HNPCC). Jellemző mutációk az APC és K-ras, MLH1, MSH2 és MSH3 MMR mutációk (Miyaki et al. 1997, Lynch HT és de la Chapelle 1999, 2003), valamint a CTNNB1, TGF^βRII, TCF4, BAX és IGF2R gének kódoló szekvenciájában megjelenő, mikroszatellita ismétlődéséket hordozó frameshift mutációk (Wortley et al. 2014). A bekövetkező genomiális átrendeződés során különböző gének, illetve mikro RNS-ek (miRNS) aktiválódnak vagy inaktiválódnak. Az MMR rendszer esetében legalább 7 fehérje ismert (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 és PMS2), melyek funkcionális heterodimereket alkotnak. Ezek hibás működése megnöveli a mutációk számát, melyek számos, a sejtfunkciókban fontos szerepet betöltő gén működését károsítják (de la Chapelle 2003). Bizonyos tumor szupresszor gének (TGFβRII, IGF2R és a BAX) kódoló régióiban is bekövetkezhet változás (Souza et al. 1996, Rampino et al. 1997, Markowitz et al. 2003, Yashiro et al. 2010). A vastagbélrák specifikusságot 5 mikroszatellita lókuszt vizsgáló mikroszatellita panel (a BAT25, és a BAT26 mononulkeotid, valamint a D5S346, a D2S123 és a D17S250 dinukleotid lókuszok) alkalmazásával határozzák meg (Boland et al. 1998). A mikroszatellita státusz alapján megkülönböztetünk mikorszatellita stabil (MSS), alacsony szinten instabil (MSI-L; a vizsgált mikroszatellita lókuszok kevesebb, mint 40%-a mutat instabilitást) és magas szinten instabil (MSI-H; a vizsgált mikroszatellita lókuszok 40%nál nagyobb arányban mutatnak instabilitást) tumorokat (Boland et al. 1998, Szentirmay és Csuka 2004).

2.2.2. CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP) státusz

A sporadikus tumorok esetében a második leggyakoribb (~15%) kialakulásért felelős útvonal (Issa et al. 2008). A karcinogenezis során fontos szerep jut a megváltozott citozin metilációnak (Baylin et al. 1998, Jones et al. 1999). Ezen epigenetikai változások egyrészről a genomiális DNS általános hipometilációja, valamint a CpG szigeteket érintő regionális hipermetiláció. Míg a hipometiláció növeli a mutációs rátát, amely a globális instabilitással függ össze (Chen et al. 1998), addig az 5' végeken elhelyezkedő szigetek hipermetilációja meghatározott gének transzkripciójának inaktivációját eredményezi (Eden et al. 1994). A vastagbélrák kialakulása során többféle promóter metiláció figyelhető meg. Az A-típusú (age-related) metiláció az ép nyálkahártya sejtekben is megtalálható, míg a C-típusú (cancer-related) metiláció kizárólagosan a tumoros seitekre jellemző. Amennyiben ez utóbbi a promóter CpG-szigetekben előfordul, akkor "CpG island methylator phenotype" (CIMP+) típusú daganatról beszélünk (Toyota et al. 1999), amely csökkent transzkripciós aktivitást eredményez. CIMP+ vastagbélrákok meghatározására már létezik a mikroszatellita panelhez hasonló 5 markerből álló panel (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 és SOCS1), melyet metiláció specifikus MethyLight valósidejű PCR technikával végeznek (Weisenberger et al. 2006).

A CIMP pozitivitás és negativitás kihatással van a tumorok mikroszatellita stabilitására is. Jass és munkatársai csoportosítása alapján CIMP pozitivitás esetén beszélhetünk alacsony, illetve magas metilációs fenotípusú daganatokról. Az előbbihez párosul a K-ras mutáció ~92%-os előfordulása, valamint kisebb mennyiségű gén metilációja, míg utóbbihoz a BRAF mutáció, valamint egyéb nagy mennyiségű gén metilációja (Jass et al. 1999, Issa et al. 2005). A hMLH1 – mint a mikroszatellita instabil tumorok egyik kulcsgénje – a DNS hibajavító rendszer működését befolyásolja, ezáltal a növekedést szabályozó génekben mutáció felhalmozódáshoz vezet (Szentirmay és Csuka 2004). Ezzel szemben a p16 a mikroszatellita stabil tumorokra jellemző tumor szupresszor gén (Merlo et al. 1995), hibája tumorképződéshez vezet. A kialakulási csoporthoz tartoznak a főként fogazott adenomákból kialakuló daganatok, melyek kialakulását az ún. fogazott ADCS útvonallal magyarázzák (Kambara et al. 2004, Jass et al. 2007).

A markerfejlesztésünk fő célja az volt, hogy bármilyen kontextusban ki tudjuk mutatni a malignus elváltozást biopsziás mintákban. Vizsgálataink megkezdésekor kromoszóma és mikroszatellita instabilitás vizsgálatok már elérhetőek voltak, de rutinszerűen sok esetben nem történtek meg. Metilátor fenotípus vizsgálat tekintetében hazai viszonylatban klinika gyakorlatról nincs tudomásunk. Ezért a marker sorozat mikroszatellita, illetve metilátor fenotípus specifikusság vizsgálatának hiányát további *in silico* vizsgálatokkal kívántuk alátámasztani.

2.3. A vastagbélrák klinikai vonatkozásai

A vastagbélrák rákelőző állapota a Vogelstein model szerint a benignus adenoma elváltozás. Nagy általánosságban 3 év után újbóli kolonoszkópos ellenőrzés javasolt azoknál, akiknek:

- az adenomák száma eléri, illetve meghaladja a hármat,
- az adenoma kerülete eléri, illetve meghaladja az 1 cm-t (Winawer et al. 2006),
- akiknél morfológiát tekintve villosus, high-grade diszplásztikus adenomát igazolnak, 1 év után újbóli kolonoszkópos ellenőrzés javasolt a magyar gasztroenterológiai útmutató és nemzetközi ajánlások alapján.

A nagyobb méretű adenomák általában villosus növekedési szerkezetűek, s nagyobb arányban fejlődik ki belőlük vastagbélrák. A diszplázia azt fejezi ki, hogy milyen mértékben tartalmaz aberráns morfológiájú és proliferációs sajátosságokkal bíró sejteket az adott elváltozás. Ennek fontosságát emeli ki az a vizsgálat, melyben megállapították, hogy habár csak az esetek 15%-a kerül a high-grade diszplasztikus kategóriába, azonban a metakrón adenomák több mint 40%-a ebből a kategóriából kerül ki 3 éves vizsgálati periódus alatt (Neugut et al. 1995). A high-grade diszplázia szövettani elkülönítése a többi adenomatózus képlettől egyre hangsúlyosabbá válik: némelyik kutatócsoport bizonyos szövettani változást már in situ karcinómának tart, de ez a meghatározás napjainkra még nem általános. Országok között is megfigyelhető különbség annak vonatkozásában, hogy mit is tekintenek HGD-nek és mit in situ karcinómának. Míg a japán szakirodalom főleg sejtmag jellemzőkre fókuszál, addig a nyugati patológiai vizsgálatok főleg a musculáris mucosae-n keresztüli invázióra helyezik a hangsúlyt (Schlemper et al. 1998). Feltehetően ez lehet az oka, hogy a japán irodalomban nagyobb arányban szerepelnek korai vastagbélrákos minták (Schlemper et al. 1998).

Toll és munkatársai vizsgálatában 83 high-grade adenomás endoszkópiás kezelésen részt vett egyént követtek nyomon 1999 és 2007 között (Toll et al. 2011). A kiinduló high-grade adenomák 1 cm-t meghaladó átmérőjű, s 53%-k villosus (villosus vagy tubulovillosus) állapotú volt. Az egyének 64%-a esetében figyeltek meg új adenoma képződését és 7%-uknál high-grade adenomát vagy vastagbéltumor kialakulását detektálták (Toll et al. 2011). Ezek a megfigyelések csak megerősítik azt a korábbi vizsgálatot, melyet 1974-1983 között 26419 adenomás 35 év feletti egyén esetén

14

végeztek. Az éves tumorrá alakuló konverziós arány 0,25%-os volt, azonban más csoportosítások alapján megnövekedett konverziót figyeltek meg. Nagyobb méretű adenoma (>1 cm átmérő), villosus struktúra és súlyos diszplázia ~3%, ~17% és ~37%-ra növelte a konverzió arányát (Eide et al. 1986). Vizsgálataink során az adenomák diszplasztikus előrehaladását tekintettük lényegi változásnak, a csoportbeosztások esetében külön kezeltük a low-, illetve high-grade diszplasztikus mintákat.

A vastagbéltumoros megbetegedések klinikai osztályozása a daganatok mélységi terjedésének a nyirokcsomókba és a távoli szervekbe történő áttétképzés. Többféle értékelési rendszer létezik, ezek alapját a TNM osztályozás képezi (**1. táblázat**).

- T: az elsődleges tumor mérete és kiterjedése
 - Tx: értékelhetetlen
 - o Tis: in situ karcinóma
 - T0: nincs jele daganatnak
 - o T1, T2, T3, T4: a tumor mérete és/vagy kiterjedése
- N: nyirokcsomókban történő kiterjedése
 - Nx: helyi nyirokcsomók nem értékelhetőek
 - N0: tumor sejtek hiánya
 - N1: metasztázisok a helyi nyirokcsomókban (a daganat megtalálható közeli és/vagy 1-3 nyirokcsomóban)
 - o N2: a daganat terjedése N1 és N3 állapot közötti
 - N3: a daganat terjedése távoli vagy számos helyi nyirokcsomóban észlelhető
- M: a távoli metasztázis mértéke
 - M0: nincs metasztázis
 - o M1: metasztázis távoli szervben

UIC/TNM		Dukes'
Stage 0	In situ carcioma	
Stage I	Nyirokcsomóban daganat nem figyelhető meg, nincs távoli metasztázis	•
	 Tumor invázió a submucosában (T1, N0, M0) 	Α
	• Tumor invázió a musculáris propriában (T2, N0, M0)	
Stage II	 Nyirokcsomóban daganat nem figyelhető meg, nincs távoli metasztázis Tumor invázió a subserosában (T3, N0, M0) Tumor invázió más szervekben (T4, N0, M0) 	В
Stage III	 Nyirokcsomóban daganat megfigyelhető, nincs távoli metasztázis 1-3db helyi nyirokcsomóban megfigyelhető (bármely T, N1, M0) 4 vagy annál több nyirokcsomóban megfigyelhető (bármely T, N2, M0) 	С
Stage IV	Távoli metasztázis (M1, valamint bármely T és N csoportosítás)	D

1. táblázat: TNM és Dukes'-féle stádiumbeosztás közötti összefüggés:

2.4. Biomarkerek

Az ideális biomarker lehetővé teszi egy kórállapot detekcióját, az ideális prognózisértékelést és gyógyszerhatás vizsgálatát, valamint magas szenzitivitással és specificitással rendelkezik, miközben alacsony számú fals negatív és pozitív eredményt produkál. Egy eredményt akkor tekintünk pozitívnak, ha a vizsgálat eredménye jelentősen eltér az egészséges emberekben mérhető értéktől. Az egészséges egyénekben tapasztalható eloszlás ismeretében a pozitív és negatív eredmények közötti küszöbértéket úgy választják meg, hogy lehetőleg minél kevesebb egészséges egyén kerüljön a pozitív tartományba. Optimális esetben egy teszt pozitív eredményt ad a vizsgált betegség fennállása esetén (valós pozitív) és negatív eredményt akkor, ha a betegség nem áll fenn (valós negatív), tehát sosem ad álnegatív (negatív teszteredmény a betegség hiányában) eredményt. Egy adott diagnosztikus eljárás optimális mivoltát két paraméter megadásával jellemezzük:

specificitás: annak a valószínűsége, hogy a diagnosztikus teszt értéke negatív lesz egy olyan egyénen, akiben nem áll fenn a vizsgált betegség. A specificitás tehát azt jellemzi, hogy a teszt milyen megbízhatóan azonosítja azokat, akikben nem kóros a vizsgált paraméter.

szenzitivitás: annak a valószínűsége, hogy a diagnosztikus teszt értéke pozitív lesz egy olyan egyénen, akiben fennáll a betegség. A szenzitivitás azt jellemzi, hogy a teszt milyen megbízhatóan detektálja a betegség fennállását.

A vastagbélrák esetében a biomarkereket többféle módon csoportosítják. A markerek csoportosításához Tanaka és munkatársai (2010) csoportosítását vettük alapul. A csoportosításban szérum/vér, széklet (Fecal Hemoglobin, gének és epigenetikai markerek alcsoportosítás) és miRNS markerek felosztás, valamint klinikai alkalmazásba vétel szerint is csoportosítanak (**2. táblázat**).

2. táblázat: Vastagbélrák detektáló biomarkerek felosztása Tanaka et al. 2010 szerint.

Klinikai alkalmazás állapota	Vizsgálat anyaga	Marker típusa	Marker/ek megnevezése	Szenzitivitás	Specificitás	Hivatkozás
	Széklet	Fehérje	FOBT	40-85%	90%	Duffy et al. 2007
Aikaimazasban	Saámum	Fehérje	CEA	30-40%	>86%	Duffy et al. 2001; Soreide et al. 2009
levo	Szerum	Karbohidrát	CA 19-9	18-65%	>90%	Hundt et al. 2007
Klinikai	Széklet	DNS	K-ras, APC, L-DNS, p53	-	-	Loktionov et al. 1998
vizsgálati stádiumban	Szérum	Fehérje	TIMP-1	-	-	Holten-Andersen et al. 1999
	Szérum	Fehérje	Spondin-2, DcR3, Trail-R2, Reg IV és MIC1	95%	91%	Habermann et al. 2006
			PSME3	-	-	Roessler et al. 2006
			NNMT	-	-	Roessler et al. 2005
			CRMP-2	61%	65%	Wu et al. 2008
			SELDI technikával: apolipoprotein C1, C3a-desArg, a1-antitripszin átadó	97%	96%	Habermann et al. 2006
			HNP 1-3	69%	100%	Melle et al. 2005
Preklinikai			MIF	47,3%	90,6%	Lee et al. 2008
vizsgalati			M-CSF	26%	92%	Mroczko et al. 2006
staatumban			M2-PK	58%, 48%	95%, 90%	Zhang et al. 2004; Schneider et al. 2005
			Prolaktin	77%	98%	Soroush et al. 2004
			CCSA-2,-3,-4	97%; 89%; 85%	78%; 82%; 91%	Brunagel et al. 2002; Leman et al. 2008
			MMP-9,-7	44,6%	95,8%	Hurst et al. 2007
			Laminin	89,3%	87,5%	Saito et al. 2005
	Plazma	zma DNS Septin-9		52%	95%	Lofton-Day et al. 2008
	Fehérvérsejt	DNS	5 markeres szet (CDA, BANK1, BCNP1, MS4A1, MGCC20553)	88-94%	64-77%	Han et al. 2008

A napi gyakorlatban a székletben jelenlévő, szabad szemmel sokszor nem látható vért kimutató széklettesztek, vérszérum esetében pedig a karcinoembrionális antigén (CEA) valamint cancer antigén (CA 19-9) tesztek terjedtek el.

A leggyakrabban alkalmazott technikai eljárások a székletvér tesztek (a guaiac alapú FOBT és az immunhisztokémiai FIT) és a kolonoszkópia. A székletben előforduló occult vér meghatározás alapját az a megfigyelés adja, hogy a nagyobb adenomák fele, a daganatok kétharmada vérzik, ami a székletben kimutatható. Az FOBT esetében a probléma az, hogy relatíve magas arányú a fals pozitív, illetve fals negatív eredmények aránya, valamint korai stádiumú eltérések kimutatásában alacsony a szenzitivitása (Burch et al. 2007). Előnyei között megemlíthető, hogy olcsó, elvégzése egyszerű, valamint a legkevésbé invazív vizsgálat. A fecal-immun hemoglobin teszt (FIT) jobb elkülönítő értékekkel rendelkezik, mint az FOBT, azonban ez együtt jár a vizsgálat árának jelentős drágulásával (Newton et al. 2012). A "gold standard" szűrő- és diagnosztikus vizsgálati módszer természetesen a kolonoszkópia, ami azonban drága, kényelmetlen, több esetben fájdalmas eljárás (Winawer et al. 2003), viszont magasabb felderítési aránya mellett, nem csak diagnosztikus, hanem gyógyító beavatkozásokra is alkalmas. A tárgyalt vizsgálatok negatív jellemzői miatt napjainkban egyre sürgetőbb olyan új diagnosztikai eljárások kifejlesztése, melyek jelentősen javíthatják a vastagbél adenomák és rákos eltérések időben történő felismerését. Növekvő igény érzékelhető specifikus biomarkerek kifejlesztésére. Különösen igaz ez a karcinogenezis meghatározó lépésének számító high-grade diszplázia és korai karcinóma közötti különbségtételre (Newton et al. 2012). A genomika és proteomika területén tapasztalható fejlődés eredményeképpen a vastagbélrák specifikus molekuláris elváltozásokat megismerhetjük és potenciális biomarkerként alkalmazhatjuk.

A CEA már évek óta alkalmazásban van, mint tumormarker vastagbélrák és egyéb rákos megbetegedések kimutatására, azonban rák jelenlétének hiányában is megfigyelték, hogy szintje magas gyulladásos állapotokban (pancreatitis, hepatitis, obstruktív tüdőbetegségek vagy gyulladásos bélbetegségek). Mivel a CRC stádiumával a CEA szint sok esetben nem korrelál, érzékenység és fajlagosság szempontjából nem alkalmazható megbízhatóan a vastagbélrák korai felismerésében (Soreide et al. 2009).

A székletből kimutatható APC, K-ras, L-DNS és p-53 DNS markerek, illetve a TIMP-1 szérum marker klinikai vizsgálata folyamatban van. A székletben található

19

hámsejtekből genetikai és epigenetikai markerek is kimutathatóak (Loktionov et al. 1998). Előnyük, hogy a széklet vértartalmához képest a sejtek leválása a hámrétegről folyamatosnak tekinthető, így a székletben lévő sejtek mutációi (K-ras, p53, APC), mikroszatellita instabilitása (MSI), vagy a hosszú DNS fragmentáltsága (L-DNS) megvizsgálható.

Malignus vastagbéltumor sejtekben az apoptózis csökken az egészséges kripta sejtekhez képest, ami lehetővé teszi az intakt genomiális DNS mérésén alapuló széklet marker alkalmazását (L-DNS) (Tanaka et al. 2010). A TIMP-1 fehérje egy olyan többfunkciós glikoprotein, amely mátrix metalloproteinázokat gátol. Vastagbéltumoros betegek esetében magasabb szintjét figyelték meg a plazmában. Már a korai stádiumban lévő tumorok esetében is megfigyelték a szintjének az emelkedését, ugyanakkor a plazmában lévő szintnövekedés nem figyelhető meg mellrákos, colon adenomás és IBD-s betegeknél (Holten-Andersen et al. 1999, 2004a; Sorensen et al. 2008). Két független tanulmányban is megerősítették, hogy magas TIMP-1 szint jellemzi az előrehaladott vastagbélrákos eseteket (Holten-Andersen et al. 1999, 2004b).

Számos szérum biomarker preklinikai vizsgálata zajlik (pl.: CRMP-2, CCSA-2, -3, -4, DcR3, HNP 1-3, Laminin, M2-PK, M-CSF, MIC1, MIF, MMP-7, -9, NNMT, Prolaktin, PSME3, Reg IV, Spondin-2, Trail-R2). Szérumban egy öt markerből álló panel (DcR3, MIC1, Reg IV, Spondin-2 és Trail-R2) 600 mintán végzett vizsgálata alapján a korai rák kimutatásának szenzitivitása és specificitása jobb volt, mint a CEA esetében (diaDexus Inc 2007). Kétdimenziós gélelektoforézis és tömegspektrométer alkalmazásával emelkedett NNMT és PSME3 szinteket mértek vastagbéltumoros betegekben. Megerősítő vizsgálatok során a CRC detektálásában a PSME3 diagnosztikus pontosságát a CEA-hoz hasonlónak, az NNMT esetében pedig annál is jobbnak találták (Roessler et al. 2005, 2006). Különböző vastagbélrákos sejtvonalak szekrétumának vizsgálatakor a CRMP-2 szenzitivitását jobbnak, specificitását gyengébbnek találták a CEA-nál. Abban az esetben, ha a két markert együttesen alkalmazták jobb specificitást (95%) és szenzitivitást (77%) értek el (Wu et al. 2008). Előrehaladott adenoma és vastagbélrák kimutatására specifikus antigénként, mindhárom CCSA fehérje markert koncentrációk alapján vizsgálták. Szenzitivitás és specificitás esetében megbízhatóan különítették el az előrehaladott állapotú betegeket (97% és 78% CCSA-2, 89% és 82% CCSA-3 és 85% és 91% CCSA-4 esetében) (Leman et al. 2008).

Az emberi neutrofil-fehérjék közül, a HNP-1-3 vizsgálata során azt találták, hogy vastagbélrákos betegek esetében a fehérjék felülexpresszálódnak: 69%-os szenzitivitás és 100%-os specificitás mellett sikerült 42 egészséges és 48 beteg mintát elkülöníteni velük (Albrethsen et al. 2005, Melle et al. 2005). Az M2-PK-ról feltételezik, hogy elhaló sejtekből kerülnek a keringésbe. Két független tanulmány is megerősítette, hogy a marker közepes szenzitivitással (48%, 58%) és erős specificitással (90%, 95%) rendelkezik, a CEA markerrel kombinálva a szenzitivitás növekedését figyelték meg (Zhang et al. 2004; Schneider et al. 2005). Kimutatták, hogy az M-CSF szérumszint vastagbélrákos betegekben magasabb értéket mutat, mint egészséges páciensek esetében, valamint a szérumszint változása erősebb összefüggést mutat nyirokcsomó metasztázisnál, mint az a CEA, illetve a CA-19-9 markerek esetén tapasztalható (Mroczko et al. 2007). 53 egészséges és 129 vastagbélrákos beteg szérum mintáinak génexpressziós vizsgálata alapján a MIF szint CRC-s betegek esetében magasabb értéket mutatott, s bár specificitás tekintetében nem érte el a CEA 100%-os értékét (csak 90,6%), korai vastagbélrák detekcióban szenzitivitása meghaladta a CEA 29,5%-os értékét (47,3%) (Lee et al. 2008). Az extracelluláris mátrix változásainak vizsgálata is fontos lépés lehet, hiszen a hám eredetű rosszindulatú daganatok fejlődése során a mátrix proteinek száma megszaporodhat a keringésben, ezáltal potenciális biomarkerként való alkalmazhatóságuk teret nyerhet. Az elülső agyalapi mirigy hormonja, a prolaktin, mindamellett, hogy számos biológiai folyamatban részt vesz, CRC jelenlétében emelkedettebb szintje mérhető. Prolaktin vizsgálata során 47 vastagbéltumoros és 51 egészséges mintát hasonlítottak össze, s egyedüli markerként 77%-os szenzitivitást és 98%-os specificitást mutatott (Soroush et al. 2004). Más tanulmányok során azt találták, hogy az MMP7 és 9 szérumszintje összefüggésben van a CRC jelenlétével (Hurst et al. 2007). További vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az MMP7 és laminin szérum markerek független prognosztikus markerként is alkalmazhatóak (Hurst et al. 2007; Maurel et al. 2007). Han és munkatársai olyan microarray vizsgálatot végeztek perifériás vérből, melynek során sikerült egy 5 tagú génpanelt (BANK1, BCNP1, CDA, MGC20553, MS4A1) (Han et al. 2008) azonosítani, amely 88-94%-ig terjedő szenzitivitással és 64-77%-ig terjedő specificitással rendelkezett. Hasonló jó eredményt értek el a SEPT9 metilációját vizsgáló perifériás vér alapú teszttel is, melynek során 95%-os specificitást és 52%-os szenzitivitást kaptak, 179 egészséges és 133 vastagbélrákos minta vizsgálata során (Lofton-Day et al. 2008).

Mint látható, napjainkra számos ígéretes markert azonosítottak, melyekkel a vastagbélrák kimutathatósága nagymértékben javult, azonban ezen markerek gyakorlati klinikai alkalmazásba vételére még nem került sor.

2.5. Microarray technika bemutatása

Napjainkra a betegségek komplex molekuláris hátterének vizsgálatára olyan sokparaméteres, párhuzamos vizsgálati módszerek állnak rendelkezésünkre, melyekkel lehetőség nyílik számos gén expressziójának és ezek kapcsolatainak egyidejű vizsgálatára. A microarray technológia a 90-es évek elején jelent meg a nagy genom projektek szekvencia adatbázisaira támaszkodva, s azóta széles körben elterjedt.

A molekuláris felderítés érdekében a különböző molekulákat szilárd fázishoz hibridizáljuk, ilyen például a klasszikus Southern blot (Southern 1975). Ezzel a hagyományos megközelítéssel ellentétben a microarray technika esetén az ismert nukleotid-szekvenciák meghatározott sorrendben vannak rögzítve a szilárd hordozóra valamint az ismeretlen nukleinsav jelzett oldat formában szerepel. A chip felszínéhez egyszálú génszekvencia darabok vannak hozzácsatolva, melyekel az adott mintában található komplementer RNS molekula mennyisége határozható meg. A porózus hibridizációs membránokat felváltották a nem porózus üveg, illetve szilikon alapú anyagok, amelyekkel a reakciótérfogat jelentősen csökkent, a reakciósebesség pedig gyorsult. A detektálást fluoreszcens festékek segítik, amelyek érzékeny jelfeldolgozást biztosítanak, több ezer, vagy százezer egyidejű reakció esetében is (Petrik 2001).

Az mRNS expressziós microarray-k segítségével lehetővé vált nagyszámú gén expressziójának összehasonlítása különböző sejtekben, szövetekben, ugyanazon típusú sejtek/szövetek eltérő állapotaiban (pl. fiziológiás és patológiás állapot; adott hatóanyag adagolásával, illetve anélkül). Az mRNS expressziós microarray technika lényege az, hogy a vizsgálatban szereplő génekkel komplementer ún. target oligonukleotidokat szilárd hordozóhoz kötik. Ezekhez hibridizáltatják az adott sejttípusból származó RNS-ről készített, jelölt egyszálú cDNS molekulákat, a próbákat. A hibridizáció mértékéből következtetnek a vizsgált gének expressziós szintjére. Technológiai megközelítés esetén a génexpressziós chippek esetében többféle megközelítést különböztetünk meg.

Az ún. "*spotted*" array-ek esetében oligonukleotidok, cDNS-ek, illetve kis fragmentumú PCR termékeket szerepeltetünk, melyeket teljes szekvencia hosszukkal viszünk a szilárd felületre. Amennyiben ismert biológiai elváltozást, útvonalat kívánunk vizsgálni akkor a megközelítőleg 1000 célszekvenciát tartalmazó cDNS array-t szokták előnyben részesíteni. Vizsgálni kívánt géneket robotkarral juttatják fel a membrán felületre. Ehhez a technikai megközelítéshez nem szükséges hibridizációs, mosási, illetve leolvasó készülék.

A kétcsatornás microarray technikai megközelítés esetében két minta cDNSének hibridizációs összehasonlításának során a cDNS-esek targetjeinek a szilárd felszínre rögzített komplementereket tervezünk. A két vizsgált mintából (pl.: kontrol vs. beteg összehasonlítás) RNS állományt izolálunk, melyből reverz transzkripcióval egy szálú komplemeter DNS-t (cDNS-t) szintetizálunk. A hibridizációs array membránjára rögzítendő kétféle próba esetében kétféle (Cy3-Cy5) hibridizációs festékkel végzünk jelölést. A cDNS-ek összekeverését és hibridizálását követően, a microarray-en detektálható fluoreszcens intenzitás eltérésének az egyik, illetve másik szín irányába (zöld-piros) következtethetünk az adott állapotban a gén felül-, illetve alulexpresszáltságára. A fluoreszcens jeleket a kétcsatornás rendszereknél két hullámhosszon 532nm-en (Cy3) és 635nm-en (Cy5) rögzítik.

A teljes genomszintű expressziós elemzésekhez *oligonukleotid microarray* technikát alkalmaznak. Habár a technikai megközelítésekben gyakran "spotted" és oligonukleotid microarray technikaként hivatkoznak rájuk, elterjedtebb a gyártó általi technikai megközelítés ismerete. Az ilyen jellegű array-ek esetén rövid ismert oligonukleotid szakaszokat visznek fel a felületre. A szekvenciák lehetnek rövidebbek (25-mer, Affymetirx), illetve hosszabbak (60-mer, Agilent)

Az egycsatornás technikai megközelítés esetén oligonukleotid target szekvenciákat rögzítenek a szilárd felszínhez. A próbákhoz kapott intenzitás értékek jelzik a relatív hibridizációs szintet. Minden mintához egy chip tartozik, s a chipek esetében belső kontrollokat alkalmaznak, melyek normalizációjával az egyes minták pontosabban és megbízhatóbban hasonlíthatóak össze. A technikai megközelítés nagy előnye, hogy egy hibás minta más minták értékelését nem befolyásolja negatívan, hiszen bármikor vissza lehet nyúlni a minták nyers intenzitás értékeihez, s a hibás vagy

23

elrontott mintát ki lehet hagyni az elemzésből. Ismertebb egycsatornás rendszerek: Gene Chip az Affymetrixtől, Bead Chip az Illuminától, egycsatornás Agilent array-ek.

2.6. Array vizsgálatok marker szelekciókra

A vastagbélrák kimutatására alkalmas molekuláris markerek nagy specifitásúnak és szenzitivitásúnak kell lennie ahhoz, hogy idejekorán jelezze a betegséget. A nagy áteresztő képességű technikák, mint például a microarray technika, kifejezetten alkalmasak a vizsgált szövetben vagy vérben az adott pillanatban lezajló folyamatok vizsgálatára. Napjainkra már lehetőség van génexpressziós markerszetek azonosítására teljes genomiális expressziós profilok alapján, s ezek alkalmazásával molekuláris biológiai klasszifikáció is elvégezhető. Génexpressziós microarray technikával számos vizsgálatot végeztek különböző ráktípusoknál, ideértve a vastagbéldaganatokat is.

A nagy teljesítményű teljes genomiális microarray vizsgálatok alkalmasak marker szelekcióra, azonban a magas költség és időigényességük miatt a diagnosztikában való alkalmazásuk bonyolult és nehézkes, mindemellett a technika alkalmazása minden esetben kiterjedt bioinformatikai elemzést, többváltozós statisztikai módszerek alkalmazását vonja maga után. A rutin diagnosztikában jobban alkalmazható valós-idejű PCR (RT-PCR) kártyák lehetővé teszik a microarray vizsgálatok által kiszűrt, potenciális markergének vizsgálatát. A RT-PCR technikával akár száz fölötti gén egyidejű vizsgálata is lehetséges (akár 384 férőhelyes lemezek). Kvantitatív RT-PCR-ek esetében a transzkriptum panelek egyedi tervezésűek. A Roche "Universal Probe Library (UPL)" próbák olyan egyedi nukelotid kémiai technikát alkalmaznak (LNA-Locked Nucleic Acid), amely lehetővé teszi nagyon rövid (akár 8-9 nukleotid hosszúságú) oligonukleotidok hatékony hibridizációját is a PCR próbákhoz. Az optimalizált primer-párok és UPL próbák hatására a RT-PCR próbák robusztus, megbízható, gyors és költséghatékony génexpressziós módszerré válnak, melyekkel a jövőben, a napi rutinban is lehetőség nyílik diagnosztikai vizsgálatok végzésére. A hagyományos hisztológiai vizsgálatokat a mintavételi problémák nehezíthetik. Az ún. orientációs hibák következtében olyan kritikus területek, mint az aberráns kripta, diszpláziás területek, vagy az in situ karcinómák rejtve maradhatnak. Az mRNS expressziót használó molekuláris alapú megközelítés támogathatja a patológusok egyre növekvő munkaterhelésének csökkentését, hiszen míg egy patológus egy metszetet lát

adott vizsgálat során, addig génexpressziós microarray esetében több minta egyidejű standardizálására nyílik lehetőség. Teljes homogenizált biopsziából származó mRNS expressziós eredmények összehasonlítása versus patológus által alkalmazott 1-2 metszetes meghatározás. A technika alkalmazása segít olyan funkcionális információk feltárásában is, amelyekre a mikroszkópos vizsgálat nem ad felvilágosítást.

2.7. Microarray vizsgálatok vastagbélrákos mintákon

A szisztematikus mRNS expressziós változások vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott platformok a "spotted" cDNS, valamint a nagy-denzitású oligonukleotid microarray-k. Az adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia vonatkozásában számos génexpressziós microarray vizsgálatot végeztek el az elmúlt években. Nagy áteresztő képességű mRNS microarray technika alkalmazásával számos tanulmány foglalkozik, de ezek eredménye sem a karcinogenezis folyamatát, sem az egyes stádiumok elkülönítését illetően nem egységes. A tanulmányok felosztását Nannini és munkatársai 2009-es összeírása alapján mutatjuk be, a microarray technológia széles témakörben való használatának alátámasztásaként. A beosztás során az alábbi főtémaköröket alkalmaztunk a táblázatos megjelenítésnél: a karcinogenezis folyamata sporadikus vastagbélrákban, prognosztika és a kezelésre adott válasz predikciója. Ezen vizsgálatokat a **Melléklet I.** fejezetben foglaltuk össze.

• A karcinogenezis folyamata sporadikus vastagbélrákban. Egyes vizsgálatok eredményei között a tumoros és egészséges, valamint az adenoma és egészséges colon nyálkahártya vonatkozásában érdemi szignifikáns génexpressziós eltérés mutatkozott (Alon et al. 1999; Notterman et al. 2001; Yanagawa et al. 2001; Lin et al. 2002; Zou et al. 2002; Williams et al. 2003; Kwon et al. 2004; Croner et al. 2005; Groene et al. 2006; Bianchini et al. 2007; Grade et al. 2007; Croner et al. 2008). A szignifikánsan eltérően expresszálódó gének száma 50-2632 között változott egészséges és vastagbélrákos minták összehasonlítása során. Egyes kísérletek során (Friederichs et al. 2005; Kwong et al. 2005) nem tudták elkülöníteni a különböző stádiumú vastagbélrákokat, ugyanakkor más vizsgálatokban (Frederiksen et al. 2003) sikeresen elkülönítették a Dukes' B és C stádiumú tumorokat a jellemző mRNS expressziós mintázatuk alapján.

- Számos tanulmányban a primer tumorok mRNS expresszióját vetették össze a metasztázisok génexpressziós mintázatával (Yanagawa et al. 2001; Agrawal et al. 2002; Koehler et al. 2004; Li et al. 2004; Kleivi et al. 2007; Ki et al. 2007; Lin et al. 2007). Ezekben a vizsgálatokban megállapították, hogy a metasztázis képzés folyamatában szerepet játszó gének elsősorban a sejt invázióval, proliferációval, adhézióval állnak összefüggésben.
- Más vizsgálatokban összevetették és sikeresen különbséget tettek bal és jobb oldali colon tumorok mRNS expressziós mintázatában az epidemiológiai, morfológiai és prognosztikai jellemzők vonatkozásában (Bertucci et al. 2004; Komuro et al. 2005; Birkenkamp-Demtroder et al. 2005).
- A rákelőző állapotnak számító sessilis és fogazott adenomák génexpressziós mintázatának összehasonlítása során számos eltérést tapasztaltak a karcinogenezissel összefüggő jelátviteli útvonalak tekintetében (Kita et al. 2006; Kim et al. 2008).
- Prognosztika (Bertucci et al. 2004; Cavalieri et al. 2007; Yamasaki et al. 2007). Az eltérő genetikai háttér felderítése nagyban elősegítheti a magas mortalitási rizikójú CRC-k molekuláris osztályozását. Wang és munkatársai 23 olyan gént azonosítottak mellyel 78%-s bizonyossággal előre jelezhető a relapszus, Dukes' B stádiumban (Wang et al. 2004). Onkológiai szempontból, a betegek egyénre szabott kezelése céljából kiemelkedő jelentőségű lenne molekuláris alapú prognosztikai rendszerek kialakítása. Dukes' B és C stádiumú CRC-k elkülönítésére és prognózisának megállapítására is kísérletet tettek már (Eschrich et al. 2005; Arango et al. 2005; Barrier et al. 2005, 2006, 2007). Eschrich és munkatársai 43 gén figyelembe vételével 90%-os pontossággal megjósolták a 36 hónapos túlélést. Arango és munkatársai 17 marker segítségével Dukes' C stádiumú betegek betegségmentes túlélés kapcsán két szignifikánsan eltérő csoportot tudott megkülönböztetni. Barrier és munkatársai a kiújulás kockázatát vizsgálták, míg D' Arrigo és munkatársai (D' Arrigo et al. 2005) 37, a metasztázis kialakulással, valamint a relapszussal kapcsolatot mutató gént azonosított. Ezen vizsgálatokat a Melléklet I. fejezetben foglaltuk össze.
 - A kezelésre adott válasz predikciója (Shimizu et al. 2005; Ghadimi et al. 2005; Kim et al. 2007; Rimkus et al. 2008) elősegítheti a személyre szabott

terápiás kezelést. Mariadason és munkatársai (Mariadason et al. 2003) 5fluorouracil (5-FU) kezelésre adott terápiás válasz vizsgálata során 420 gén esetében figyeltek meg korrelációt az mRNS expresszió és a terápiás válasz között. D' Arango és munkatársai (D' Arango et al. 2004) egy 80 génből álló csoport meghatározásával sikeresen jellemezték 30 vastagbélrák sejtvonalon az oxaliplatin proapoptotikus hatását. Del Rio és munkatársai (Del Rio et al. 2007) 21 elsődleges előrehaladott CRC mintán a leukovorinra és a FOLFIRI kezelésre adott válaszreakciót vizsgálták génexpressziós szinten: 95%-os bizonyossággal elkülönítették a terápiaérzékeny és a terápiarezisztens betegcsoportokat. Ezt követően 80 előrehaladott CRC mintán 629 olyan gént azonosítottak, melyek meghatározzák a cetuximab kezelés vonatkozásában a klinikai választ (Khambata-Ford et al. 2007). Ezen vizsgálatokat az **Melléklet I.** fejezetben foglaltuk össze.

2.8. A mRNS microarray eredmények megerősítésére szolgáló módszerek

A génexpressziós microarray technológia esetén annak kiderítése és megerősítése érdekében, hogy a kimutatott jelintenzitás valóban korrelál a tényleges génexpresszióval, független vizsgálati módszereket is vizsgálatainkba vontunk. A leginkább elfogadott megerősítő módszer a real-time PCR-s vizsgálat, melynek során a génexpressziós microarray vizsgálat a csoportok között eltérően, alul- illetve felülexpresszált géneket vizsgálja. A valós idejű RT-PCR vizsgálat mellett, a fenotípusos megjelenésért felelős fehérje expressziót is vizsgáltuk, immunhisztokémiai vizsgálatok során.

2.8.1. Valós idejű RT-PCR vizsgálatok

A real-time PCR fluoreszcens jelölésnek köszönhetően lehetővé teszi a PCR termékek valós idejű detektálását, nyomon követését. A fluorimetriás detektálást a SYBR Green I fluoreszcens DNS-festék a kettősszálú DNS-molekulákba történő beépülése teszi lehetővé. Speciális fluoreszcens próbákkal – például hibridizációs próbákkal vagy ún. fluorogén 5' nukleázzal (TaqMan próbákkal) – a termék szekvencia specifikusan kimutatható. A hibridizációs próbapár két eltérő fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid, melyek eltérő távolságban (1-3 nukleotid) hibridizálnak a PCR termékre. Az akceptor esetében mérjük a fényemissziót, melyet a gerjesztett donor festék fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) révén gerjesztünk. A próba két végén módosított (5' végen reporter, 3' végen quencher) molekulát tartalmaz. A próba (20-30 bp hosszúságú oligonukleotid) receptor és quencher festékkel jelölt oligonukleotid, ahol a reporter festék emissziójának detekciója, csak a DNS-polimeráz lehasítása esetén mérhető. A real-time PCR-ek különböző hullámhosszú gerjesztési fényforrást (LED vagy lézer) tartalmaznak és különböző hullámhosszú fluoreszkáló jelet képesek detektálni digitális CCD kamerával vagy PMT-detektorral (fotoelektronsokszorozó). Napjainkra kifejlesztettek már ultagyors készülékeket is melyek légbefújásos technológiával működnek, akár 20°C/másodperc fűtési-hűtési sebesség (Light Cycler) is megvalósítható használatukkal (Dezső et al. 2005).

A reakció előrehaladtával a detektor érzékeli az exponenciálisan növekvő fluoreszcenciát, melyből az adott minta RNS tartalmára következtetünk. Az

28

amplifikációs görbék elemzése által a nukleinsav kvantitatívan elemezhető, a PCR termék mennyiségét az áttörési ponttal jellemezhetjük (Ct), amely azt a ciklusszámot jelenti, amelynél a ciklusonként mért fluoreszcencia exponenciálisan kezd növekedni. A Ct érték annál kisebb, minél nagyobb a kiindulási templát nukleinsavról keletkező amplikon mennyisége. A Ct értékek a kiindulási nukleinsav mennyiségről adnak információt, hiszen a PCR termék mennyisége – bizonyos koncentráció határok között – arányos a kiindulási nukleinsav mennyiséggel. Ismeretlen minta estében az áttörési pont mérésével meghatározható annak koncentrációja. Egy standard sor segítségével, amely az amplifikálandó nukleinsavat ismert koncentrációkban tartalmazza, kalibrációs görbe vehető fel, amely az áttörési ciklusszámokat a koncentrációk logaritmusának függvényében mutatja (Dezső et al. 2005). Génexpresszió összehasonlítás esetén belső kontrollként állandó expressziót mutató ún. háztartási (housekeeping) gén mRNS szintjét mérjük a vizsgált célgén expressziós szintje mellett, mellyel a meghatározás idején korrigálunk.

2.8.2. Fehérje expressziós vizsgálatok

Míg a tárgyalt két technikai megközelítés, a génexpressziós microarray és RT-PCR technikák a gének aktivitását és működését prediktálják, addig a tényleges fenotípusos megjelenésről nem kapunk információt. A különböző fehérjék poszttranszlációs módosulásai, sejten belül lokalizációjuk változása tovább bonyolítja a meghatározást. Génexpressziós szinten kapott vizsgálatok eredményét ezért fehérje szinten is ellenőrizni kell. Az ilyen jellegű expresszió vizsgálatára nagy teljesítményű szöveti microarray (tissue microarray, TMA) módszert vontunk be vizsgálatainkba.

A génexpressziós vizsgálatok során elemzett és kiválaszott markerek eredményeinek validációja a fehérje expressziós megerősítésen túl, az expresszálódó fehérjék szöveti elhelyezkedéséről is információt nyújt. Az adott patomechanizmussal összefüggő fehérje változások vizsgálatához – illetve későbbi diagnosztikai alkalmazás esetén – nagyszámú szövetmintán történő ellenőrzése elengedhetetlen. A TMA alkalmas ezen szempontok érvényesítésére, s költséghatékonysági szempontból is megfelelő. A vizsgálat során több szöveti korongot rögzítenek ismert elrendezésben a microarray felületre, majd ezt kezelik a megfelelő ellenanyaggal, ami által több mintán ehyszerre vizsgálható a kérdéses fehérje expressziója, valamint szöveti lokalizációja.

Formalinban fixált paraffinba ágyazott szövetblokkból – a vizsgálatba vont mintaszámtól függően – 1-2 milliméteres átmérőjű szövethengereket (ún. core-okat) helyeztünk el közös blokkokba, majd ezekből 5 µm-es vastagságú szövettani metszeteket készítettünk hagyományos tárgylemezre. Az átmérő tekintetében az egyszerre vizsgálandó mintaszám, valamint a vizsgált metszeti terület miatt az optimális meghatározás fontos. Leggyakrabban a 4x6-os, 6x10-es, 8x12-es vagy 10x24-es elrendezést alkalmazzák. A TMA lemezek immunhisztokémiai jelölésére tetszőlegesen kiválasztott fehérje ellenes antitesteket alkalmazunk.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink kérdése, célja:

- Nagy teljesítményű génexpressziós array technológiával azonosítható-e olyan transzkriptum csoport, amelyek expresszió változása követi a Vogelsteinmodelt?
- A fenti transzkriptum csoportból vannak-e olyan gének, amelyek expressziós változása érzékenyen és fajlagosan segíthet az egészséges, adenomás és vastagbélrákos szöveti minták elkülönítésében? Az eltérések hám- vagy stromális eredete meghatározható-e?
- A transzkriptum sorozat alkalmazásával elkülöníthetőek-e a súlyosan diszplasztikus (high-grade) adenoma és korai vastagbélrákos minták?
- A transzkriptum csoport független mintaszeten (Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázis) történő tesztelés során is alkalmazhatónak mutatkozik-e mintasorozatok elkülönítésére, valamint mutat-e metilációs fenotípus vagy mikroszatellita instabilitás specificitást?
- Célunk volt továbbá génexpressziós array technológia eredményének független mintacsoporton, konvencionális RT-PCR módszerrel történő validációja.
- További célkitűzéseink az azonosított transzkriptum csoport fehérjeszintű megerősítése volt szöveti mintákon, immunhisztokémiai módszerrel.
- Célul tűztük ki a kapott szöveti transzkriptum csoport elkülönítő képességének vérmintákon történő tesztelését is annak céljából, hogy a szöveti szinten talált elkülönítő gének perifériás szinten is alkalmasak-e a betegségcsoportok megkülönböztetésére.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Beteg minták

4.1.1. Biopsziás minták

Az elvégzett vizsgálatokat a 2. ábra mutatja be. Előzetes tájékoztatás és írásos beleegyezés után a kezeletlen betegektől biopsziás mintavételt végeztünk endoszkópos vizsgálat során. A mintákat -80 °C-n tároltuk RNALater reagensben (Qiagen Inc, Germantown, USA). Összesen 147 biopsziás mintát (53 minta az első mintasorozat esetében, s további 94 frissen fagyasztott minta a második mintasorozat esetében) elemeztünk. Az elsőként elkészített "tréning" microarray vizsgálat során összesen 53 mintát vizsgáltunk (11 egészséges, 9 low-grade diszplasztikus adenoma, 11 high-grade diszplasztikus adenoma, 10 korai CRC, 12 előrehaladott CRC) (Galamb et al. 2008a, 2008b, 2010). A Gene Expession Omnibus adatbázisában az adatok elérhetőek (hivatkozási azonosító: GSE4183). A későbbiek folyamán újabb microarray mintasorozatot vontunk be vizsgálatainkba validáció céljából, "teszt" mintasorozatként. Összesen 94 (38 egészséges, 16 low-grade diszplasztikus adenoma, 13 high-grade diszplasztikus adenoma, 14 korai CRC, 13 előrehaladott CRC) minta került hibridizálásra. A Gene Expession Omnibus adatbázisban az adatok elérhetőek (hivatkozási azonosító: GSE37364). Minden minta esetében teljes RNS kivonást végeztük az Affymetrix microarray elemzéshez. Független RT-PCR elemzéshez összesen 68 (20 egészséges, 13 low-grade diszplasztikus adenoma, 11 high-grade diszplasztikus adenoma, 10 korai CRC, 10 előrehaladott CRC, valamint 4 ismeretlen besorolású CRC) minta került hibridizálásra. A microarray és RT-PCR vizsgálatokba bevont diagnosztikus csoportokat és az esetszámokat a 3. táblázat tartalmazza. Későbbi vizsgálatok során 2 high-grade diszplasztikus adenoma a korai vastagbélrák minták közé sorolódott, a "Medsol" integrált kórházi informatikai rendszerben végzett minta utánkövetést követően. Mint kiderült újonnan kért patológiai vélemény in situ karcinóma besorolást eredményezett. A patológiai vélemények időpontjának közelsége kizárja a diszplázia-karcinóma konverziót. További vizsgálatok során korai vastagbélrák mintákként kezeltük a két mintát. A lézer mikrodisszekciós génexpressziós elemzés során összesen 36 mintát – 6 egészséges, 6 adenoma és 6 CRC – alkalmaztunk hám és stróma régióból (3. táblázat). A vizsgálatainkat a Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság (TUKEB szám: 69/2008) is jóváhagyta.

4.1.2. Vérminták

Összesen 47 vérminta (16 egészséges, 12 adenoma és 19 CRC – 7 korai, 12 előrehaladott CRC) elemzését végeztük el. A microarray vizsgálatokhoz alkalmazott diagnosztikus csoportokat és a páciensek számát a **3. táblázat** tartalmazza. Adenoma minták között a diszplázia foka nem került meghatározásra, ezért ezeket közösen, egy csoportban tüntettük fel. Vizsgálatainkat a Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság (TUKEB szám: 69/2008) is jóváhagyta.

4.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok mintaanyaga

Előzetes tájékoztatás és írásos beleegyezés után a kezeletlen betegektől biopsziás mintavételt végeztünk endoszkópos vizsgálat során. Két ütemben végeztük a mintaizolálást. Az első körben vizsgált 11 transzkriptum esetében indított fehérjeexpressziós vizsgálataink során, 7 esetben kaptunk értékelhető eredményt az alkalmazott antitestekből szöveti mintákon. Ezen minták eltérő számmal fordulnak elő antitestenként, pl. leázás miatt. Ebben a vizsgálati körben az egészséges (n=10-12), adenoma (tubulláris és tubullovillosus; n=37-64) és vastagbélrákos (n=13-30) szövetminták eltérő mintaszámmal lettek vizsgálatainkban kiértékelve (**3. táblázat**).

További génexpressziós vizsgálataink eredményeképpen, immunhisztokémiai vizsgálatok során ADCS specifikus antitesteket is kerestünk, melyek közül a legjobbnak bizonyuló 2 marker a micorarray vizsgálatok 11 transzkriptumával átfedett. Ez utóbbi vizsgálati körben összesen 168 minta (35 egészséges, 75 adenoma – 37 low-grade diszplasztikus, 38 high-grade diszplasztikus, valamint 58 CRC – 29 Dukes' A és B, valamint 29 Dukes' C és D tumor) lett vizsgálatainkba vonva. A vizsgálatokhoz alkalmazott diagnosztikai csoportokat a **3. táblázat** tartalmazza. Az egészséges csoportba tartozó minták esetében a kolonoszkópia pozitív széklet occult vér teszt miatt lett végezve. Korábbi gyulladásos bélbetegség, kolorektális vagy egyéb neoplázia nem ismert. Vizsgálatainkat a Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság (TUKEB szám: 69/2008) is jóváhagyta.

3. táblázat: A vizsgálatai	nkba vont microarrav. RT-PC	R és immunhisztokémiai mint	ták diagnosztikus cso	portonkénti megoszlása.
- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				I

Csoport	"Tréning" mintasorozat	"Teszt" és független t mintasorozat		Független LCM (hám és stróma) mintasorozat	Független imm mintas	Független vér mintasorozat	
	Affymetrix microarray (GSE4183)	Affymetrix microarray (GSE37364)	RT-PCR	Affymetrix microarray (LCM)	Immunhisztokémia	Immunhisztokémia (Sipos et al. 2014)	Affymetrix microarray
Egészséges kontroll	11	38	20	6-6	10-12	35	16
low-grade diszplasztikus adenoma	9	16	13	6.6	37-64	37	12
high-grade diszplasztikus adenoma	11	13	11	0-0		38	
CRC Dukes' A- B	10	14	10	6.6	13-40	29	7
CRC Dukes' C- D	12	13	10	0-0		29	12
Ismeretlen CRC stádium	-	-	4	-	-	-	-
Összes vizsgált minta	53	94	68	18-18	változó	168	47

4.2. Módszerek

4.2.1. Mintaizolálás

Szöveti minták esetében a teljes RNS izolálásához RNeasy Mini Kitet (Qiagen) használtunk, s az izolálás során a gyártó előírásait követtük. Minőségi és mennyiségi vizsgálatokat végeztünk spektrofotometriával (NanoDrop) és kapilláris gélelektroforézissel (2100 Bioanalyzer és RNS 6000 Pico Kit Agilent Inc, Santa Clara, USA). 4,82 \pm 0,60 µg totál RNS-ből biotinilált cRNS próbákat szintetizáltunk, a fragmentáláshoz One-Cycle Target Labeling és Control Kitet alkalmaztuk a gyártó Affymetrix leírása szerint.

A lézer mikrodisszekció során összesen 36 mintát – 6 egészséges, 6 adenoma és 6 CRC – alkalmaztunk hám és stróma régióból. Régiónkénti minták nem azonosak. Minőségi és mennyiségi vizsgálatok megegyeznek a szöveti mintáknál leírtakkal.

A génspecifikus forward és reverz primerek, valamint a fluoreszcens jelölt hidrolizációs próbák (Universal Probe Library, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland, Basel) liofilizálásra kerültek 384 mintahelyes PCR lemezekre. Szöveti minták RT-PCR-es vizsgálata esetében 2,5 µg totál RNS reverz transzkripcióját végeztük el 20 egészséges, 24 adenomás, 24 vastagbélrákos biopszia mintán. A cDNS minták minősége SDHA (szukcinát dehidrogenáz komplex, A alegység, flavoprotein) housekeeping génnel ellenőriztük. A kiválasztott gének expresszió vizsgálatához 5 ng/minta cDNS templátból indítottuk LightCycler 480 Probes Master (Roche gyártmány) RT-PCR készülékkel.

Vérminták esetében a teljes RNS izolálásához Paxgene Blood RNA Kitet (Qiagen) használtunk, s az izolálás során a gyártó előírásait követtük. Az izolált RNS minták koncentrálásához GeneChip Blood RNA koncentráló kitet (Affymetrix Inc, Santa Clara, US) használtunk. Minőségi és mennyiségi vizsgálatokat végeztünk spektrofotometriával (NanoDrop) és kapilláris gélelektroforézissal (2100 Bioanalyzer és RNS 6000 Pico Kit Agilent Inc, Santa Clara, USA). 5µg totál RNS-ből biotinilált cRNS próbákat szintetizáltunk. A fragmentáláshoz az Affymetrix leírása szerint One-Cycle Target Labeling és Control Kitet, valamint globin redukcióra PNA oligonukleotidokat (Applied Biosystems, Foster City, US) alkalmaztunk. A vérminták más betegektől származtak, mint a biopsziás minták. A vérvétel előzetes tájékoztatás és írásos beleegyezés után, az endoszkópos vastagbélvizsgálat előtt történt meg. 9 ml perifériás

vért gyűjtöttünk Paxgene Blood RNA csövekbe (Qiagen Inc, Germantown, US). A mintákat -80 °C-n tároltuk. A vizsgálatot a Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottsága (TUKEB szám: 69/2008) is jóváhagyta. Az elvégzett vizsgálatok összesített folyamatábráját a **2. ábra** mutatja.


4.2.2. Gén és fehérje-expressziós vizsgálati módszerek

Microarray - vérmintákon (n=47 vérminta ;16 egészséges, 12 adenoma és 19 CRC – 7 korai, 12 előrehaladott CRC)

2. ábra: Az elvégzett vizsgálatok folyamatábrája. I., II. Microarray mintasorozatok N vs. Ad vs. CRC összehasonlításban ("teszt" és "tréning" sorozatok). III. Független RT-PCR-es validáció N vs. Ad vs. CRC összehasonlításban. IV. *In silico* vizsgálatok, N vs. Ad, N vs. CRC, valamint metilációs fenotípus és mikroszatellita specificitás specifikusság vizsgálata. V. LCM vizsgálatok N vs. Ad vs. CRC összehasonlításban hámon és strómán. VI. High-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrák minták összehasonlítása 11 marker esetében microarray és RT-PCR eredményeken. Két kiválasztott fehérje marker vizsgálata az említett mintacsoportok összehasonlítására. VII. 7 antitest fehérjeszintű vizsgálata a 11 transzkriptumból szöveti microarray-en. VIII. Microarray vizsgálatok N vs. Ad vs. CRC összehasonlításban vérmintákon.

4.2.2.1. Egycsatornás oligonukleotid microarray rendszer (Affymetrix)

A "tréning" és "teszt" microarray mintasorozat esetében eltérő biotinált cRNS próbák szintéziséhez és fragmentálásához eltérő kiteket alkalmaztunk ("tréning" esetében – Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit – "teszt" esetében – One-Cycle Target Labeling and Control Kit). A korábbi vizsgálat során alkalmazott megközelítést kivonták a forgalomból, s helyettesítették a "teszt" mintasorozat esetében alkalmazott termékkel. A továbbiakban a biopsziás és vérminták kezelése megegyezik. A mintákat hibridizációs oldatban vittük a chipre: a fragmentált cRNS mintából 10 µg mennyiséget hibridizáltunk HG-U133 Plus2.0 microarray-re (Affymetrix) 45°C-on, 16 órán keresztül. Közben a jelölt próbáinkat is tartalmazó folyadékot áramoltattunk a microarray felszínén, elősegítve a komplementer szálak kötődését. Ezt a mosási lépések követték, amelyek során a nem kötődött próbákat eltávolítottuk. A hibridizációt követően eltávolítottuk a rosszul, valamint a nem kötődött jelölt komponenseket, eltérő hőmérsékletű és sókoncentrációjú pufferek alkalmazásával. Α módosított nukleotidokhoz fluoreszcens festéket kapcsoltunk, melynek mennyisége alapján a fluoreszcencia intenzitásból a génexpresszió mértékére következtettünk. A fluoreszcens jelölés első lépésében streptavidin-phicoerythrin (SAPE) konjugátumot kapcsoltunk a biotinhoz. Ezt követően SAPE specifikus biotinilált antitesttel végeztünk immunreakciót, amelyhez befejező lépésként ismét SAPE molekulát kapcsoltunk. A chipeket Fluidics Station 450 automatán mostuk és festettük meg antitest amplifikációs festés alkalmazásával. Ezután lézerrel gerjesztve a fluoreszcens festéket a kibocsátott fluoreszcens fényt mértük meghatározott hullámhosszon. A fluoreszcens jeleket GeneChip Scanner 3000 készülékkel detektáltuk. Így kapjuk meg minden egyes microarray pontra a fluoreszcencia intenzitási értéket, ami információt ad a hibridizáció és végső soron az adott gén kifejeződésének mértékéről.

4.2.2.2. Lézer mikrodisszekció

A lézer mikrodisszekció lehetővé teszi, hogy szöveti mintákból kis – pár ezer sejtes – részleteket metszünk ki, hogy ezeket a biológiailag homogénebb csoportokat külön vizsgálat alá vonhassuk. Az egycsatornás oligonukleotid microarray rendszernél ismertetett technikai eljárásokat alkalmaztuk. Ezáltal lehetőség nyílik a pontosabb mikrokörnyezet közötti különbségek felderítésére. A lézer mikrodisszekció során inverz

mikroszkópot használunk, amely lézerfény-generátor alegységgel van ellátva. A mikroszkóp tárgyasztalát egy precíziós mikromotoros rendszerrel mozgathatjuk, miközben az áthaladó lézersugár segítségével µm-es méretű szöveti részeket vághatunk körbe. A tárgyasztalhoz mintagyűjtő kar csatlakozik, amely mintaösszegyűjtés esetén a mintát műanyag kupakba katapultálja (Galamb et al. 2010).

4.2.2.3. Független Gene Expression Omnibus adatbázis adatok

A vizsgálatainkba bevont független vizsgálatokat a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisából töltöttük le. Az összehasonlítani kívánt minták is HG-U133 Plus2.0 microarray chipen készültek biopsziás mintákon. A vizsgálatokat végző kutatócsoportok a MIAME elveknek megfelelően közzétették vizsgálatuk adatait a GEO adatbázisban (azonosítók: GSE8671 (Sabates-Bellver et al. 2007), GSE18105 (Matsuyama et al. 2010)). A GSE8671 esetében összesen 64 (32 egészséges és 32 adenomás) mintát, a GSE18105 esetében összesen 111 (17 egészséges és 94 vastagbélrákos) mintát hasonlítottunk össze. A vizsgálatunk tárgyát képező markersorozatot a letöltött mintasorozatokon is megvizsgáltuk. További *in silico* vizsgálatunk tárgyát képezte a markersorozat CRC specifikusságának tisztázása érdekében, a GSE39582 azonosító számú (Marisa L. et al. 2013) génexpressziós microarray mintasorozat 19 egészséges mucosa, valamint kiválasztott 24 CIMP- és 13 CIMP+ és 14 MSI és 22 MSS vastagbélrák mintájának összehasonlítása.

4.2.2.4. Valós idejű RT-PCR vizsgálatok

A 11 transzkriptum expressziós mintázatának validálásához kereskedelmi forgalomban elérhető RT-PCR próbákat alkalmaztunk (www.roche-appliedscience.com). Az RealTime ready próbák listáját táblázatba foglaltuk (**4. táblázat**). A táblázat tartalmazza a gén megnevezését, szimbólumát, valamint a hozzátartozó assay azonosítót, a génre tervezett amplikon hossz és annak pozíciója is megtalálható a táblázatban. A primerek szekvenciáit nem tudjuk megadni, mivel kereskedelmi forgalomban alkalmazott assay-ekről van szó. Minta minőség ellenőrzésre SDHA housekeeping gént alkalmaztunk. A kiválasztott gének expresszió vizsgálatához 5 ng/minta cDNS templátból indítottuk LightCycler 480 Probes Master (Roche gyártmány) RT-PCR készülékkel. A vizsgálat során a felhasználói kézikönyv szerint

jártunk el (http:// www.roche-applied-science.com). A 10 perces 95 °C-os enzim aktiváció és denaturáció után, 45 PCR ciklus következett (10 másodperces 95°C-os denaturáció, 30 másodperces 60°C-os hőkezelés majd 1 perces 72°C-os lezáró szakasz). A legalkalmasabb referencia gén kiválasztásához során a következő 7 háztartási gént vontunk be RT-PCR-es vizsgálatainkba: GAPDH (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, B2M (β 2-mikroglobulin), ACTB (β -aktin), HPRT1 (hipoxantin foszforibosil transzferáz 1), RPL13A (riboszomalis fehérje L13a), 18S (18S riboszoma RNS) és YWHAZ (tirozin 3-monooxigenáz/triptofán 5-monooxigenáz aktivációs fehérje, ς polipeptide).

Assay ID	Gén	Cén név	Amplikon	Pozició	Intron
Assay ID	szimbólum	Och nev	hossz	I UZICIU	spanning
103015	CA7	karbon anhidráz VII	77	416-492	+
100950	IL1B	interleukin-1β	87	162-248	+
103133	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonista	76	343-418	+
103136	IL8	interleukin-8	92	879-970	-
103109	GREM1	gremlin-1	111	144-254	+
105522	CXCL1	kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1	105	340-444	-
103070	CXCL2	kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 2	95	431-525	+
103045	COL12A1	XII típusú α1 kollagén	66	2287-2352	+
103035	CHI3L1	kitináz 3-szerű 1	76	433-507	+
103210	SLC7A5	folyadék transzporter család 7, 5. tagja	72	1500-1571	+
103167	MMP3	mátrix metalloproteináz 3	110	1210-1319	+
101128	GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	112	30-141	+
102065	B2M	β2-mikroglobulin	76	360-435	+
102488	ACTB	β-aktin	102	1047-1148	+
102079	HPRT1	hipoxantin fosforibozil transzferáz 1	102	218-319	+
102119	RPL13A	riboszómális fehérje L13a	124	317-440	+
104092	RN18S1	RNA, 18S riboszóma 1, 18S riboszómális RNS	73	982-154	-
102125	YWHAZ	tirozin 3-monooxigenáz/triptofán 5-monooxigenáz aktiváló fehérje, c-polipeptid	130	453-582	+

4. táblázat: Real-time ready assay-k RT-PCR validáció során. A táblázat tartalmazza az assay azonosítóját, a hozzátartozó gén megnevezését, szimbólumát. Az amplikon hosszát, s pozícióját, valamint intron irányát.

4.2.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az előzetesen mRNS expressziós változások alapján kiválasztott gének immunhisztokémiai vizsgálata tissue microarray (TMA) lemezen történt. A 11 transzkriptum esetében 7 marker esetében nyílt lehetőségünk (CA7, COL12A1, IL8, MMP3, SLC7A5, CXCL1-2, IL1RN) immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésére, mely markerek közül a CXCL1-GRO antitest két mRNS markert is lefed. A fennmaradó 3 fehérjemarker (CHI3L1, IL1B és GREM1) beállítása esetében nem jártunk sikerrel. Negatív kontrollokat nem alkalmaztunk vizsgálataink során, mivel az egészséges mintákhoz való eltéréseket vizsgáltunk jó és rosszindulatú tumorok esetében. A kiválasztott markerek fehérjeszintű vizsgálatához formalin fixált, paraffinba ágyazott egészséges (n=10-12), adenoma (tubulláris és tubullovillosus; n=37-64) és vastagbélrákos (korai és kései; n=13-30) szövetmintákat használtunk fel. Az endogén peroxidázt 0,5%-os hidrogén-peroxid és metanol keverékével blokkoltuk (30 perc, szobahőmérséklet), majd antigén feltárást végeztük (TRIS-EDTA puffer a COL12A1, IL1RN, CXCL1/2/3 esetén; TRS puffer a CA7, SLC7A5, IL8, MMP3 esetében) mikrohullámú melegítéssel (900 W teljesítményen 10 percig, majd 370 W teljesítményen 40 percig). A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 1%-os BSA oldatot alkalmaztunk. Az egyes ellenanyagokat az 5. táblázat tartalmazza.

Gén szimbólum	Gén név	Antitest klón/gyártó	Antitest hígítás
CA7	Karbon anhidráz VII	ab103116	1:100
COL12A1	XII típusú α1 kollagén	HPA009143/P HPA 009143, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:40
IL8	Interleukin 8	ab106350, Abcam, Cambridge, USA	1:40
MMP3	Mátrix metalloproteináz 3	ab51202, Abcam, Cambridge, USA	1:200
SLC7A5	Folyadék transzporter család 7, 5. tagja	ab51202, Abcam, Cambridge, USA	1:200
CXCL1, -2	Kemokin (C-X-C motívum) 1-es, 2-es ligandum	R&D systems, Minneapolis, USA	1:80
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonista	HPA 001482, Sigma- Aldrich St. Louis, USA	1:300

5. táblázat: A	fehérjeszintű	vizsgálatok	során	alkalmazott	antitestek	és	jellemző
tulajdonságaik							

A primer ellenanyagok hozzáadása után DakoCytomation EnVision SystemLabelled Polymer-HRP (K1395, Dako, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin-hidrogén-peroxidázkromogén-szubsztrát rendszerrel (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako, Glostrup, Dánia) hajtottuk végre a jelkonverziót. A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Flash 250, 3DHISTECH, Budapest). A metszetek kiértékelését digitális mikroszkóp (Pannoramic Viewer v:1.15.2, 3DHISTECH, Budapest) segítségével végeztük az alábbi szemikvantitatív pontozási (score-) rendszer alkalmazásával:

- -2: nincs immunreakció a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában),
- 0: gyenge festődés a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában),
- +1: közepes festődés a strómában,
- +2: erős immunreakció a sejtek citoplazmájában (a hámban vagy a strómában).

Egyes esetekben a közepesen erős/erős citoplazmatikus festődés mellett a magfestődés is megjelent, amit az eredmények fejezetben külön tárgyalunk.

További immunhisztokémiai vizsgálatban, Sipos és munkatársai (2014) korábbi génexpressziós microarray vizsgálatok elemzése alapján, olyan ADCS specifikus transzkriptumokat kerestek, melyek génexpressziós, valamint megerősítő immunhisztokémiai képe alapján alkalmasak lehetnek az egészséges, adenomás és vastagbélrákos minták elkülönítésére. A génexpressziós eredmények alapján, 26 potenciális ADCS-specifikus transzkriptum fehérjeszintű elemzését is elvégeztük szöveti microarray rendszeren. Ezek részletes ismertetésétől három fehérjemarker kivételétől eltekintenénk mivel a vizsgált specifikus transzkriptumok csak ebben a három esetben fedtek át a vizsgált 11 transzkriptummal, valamint a 3 markerből 2 bizonyult a publikáció esetében is a legalkalmasabbnak az ADCS specifikusság tekintetében. Összesen 35 egészséges, 75 adenomás (37 low-grade diszplasztikus és 38 high-grade diszplasztikus adenoma), valamint 58 vastagbélrákos (29 Dukes' A-B, 29 Dukes' C-D stádiumú CRC) mintát elemeztünk (Sipos et al. 2014). Ezen fehérjemarkereket és jellemző tulajdonságaikat a 6. táblázat tartalmazza.

Gén szimbólum	Gén név	Antitest klón/gyártó	Antitest hígítás	Pozitív kontroll
MMP3	mátrix metalloproteináz 3	SB14d/Abcam ab51202/M	2 µg/ml	Humán vastagbél adenokarcinóma
CXCL1	kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1	31716/R&D Systems MAB276/M	1 μg/ml	humán lép
COL12A1	XII típusú α1 kollagén	n.a./Atlas HPA009143/P	1:200	humán vázizom

6. táblázat: A fehérjeszintű vizsgálatok során alkalmazott antitestek és jellemző tulajdonságaik

Az immunreakció optimalizációját követően a markerek megfelelően működtek a szöveti microarray elemzés során. Az antitest jelölést követően a TMA lemezeket digitalizáltuk. Az immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív értékelését külön-külön végeztük el a hám és a lamina propria területén.

4.3. A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai elemzések

Feldolgozás és minőségi kontrol. Az Affymetrix oligonukleotid microarray CEL fájl formátummal dolgozik, amelyet az intenzitások tárolására fejlesztettek ki. Ezen belül egy cella egy próbát – egy gén bizonyos szakaszát – reprezentálja, minden Affymetrix GeneChip[®] próba sorozat tartalmaz egy 25-mer méretű 8-20 párban lévő "Perfect Match" (PM) és "Mismatch" (MM) próbát, mellyel a nem specifikus mRNS-ek kötődését határozhatjuk meg. Az MM az oligo közepén elhelyezkedő cseréjétől eltekintve teljesen megegyezik a PM szekvencia sorrenddel. A nyers fluoreszcencia intenzitások vizsgálatára R 3.2.1 programozási nyelvet (statisztikai környezetet) alkalmaztunk, azon belül is Bioconductor programcsomagot (R Development Core Team, 2011). A minőségi elemzéseket a "Tumour Analysis Best Practices Working Group" (Tumor Analysis Best Practices Working Group, 2004) javaslatai alapján végeztük el. Első lépésben a hibridizált chipek minőségellenőrzését (OC, quality control) hajtottuk végre. A kapott eredmények közül a jelenléti százalékot (present call) emelnénk ki, ami megmutatja, hogy a gének hány százaléka expresszált az adott szöveti környezetben. A beolvasásra került microarray chipet az esetleges melléktermék jelenlét, "present call" százalék (25-55%) és RNS degradáció szerint értékeljük.

Amennyiben az érték az említett skála értékeitől jelentősen eltér, ott fennáll a lehetősége az amplifikációs vagy hibridizációs hibának, esetleg a minta nem megfelelő minőségének. A QC során további értékelhető minőségi adatokat tudunk összehasonlítani, mint az RNS "digestion plot", ami meredekségével mutatja a kiindulási minta minőségét. További információt ad a fluoreszcencia intenzitás eloszlása a hibridizációról. A minőségi vizsgálatot követően az előfeldolgozás szakasza (preprocessing) következik, amely három fő lépésből áll: háttérkorrekció, normalizáció és összegzés. Az első lépésben történik a háttérkorrekció, ahol kivonjuk a cellák körüli fluoreszcencia intenzitást a cellákban mért értékekből. Ezt követően normalizáljuk a mintákat, ami azt jelenti, hogy közös szintre hozzuk az egyszerre vizsgált és elemzett chipek fluoreszcencia intenzitás tartományát és eloszlását. Megkülönböztetünk chipen belüli és chipek közötti normalizációkat. A normalizált értékeket leggyakrabban kettes alapú logaritmus transzformáció után származtatjuk. A normalizációt az összegzés követi, ahol az egy génhez tartozó fluoreszcencia intenzitásokból egy értéket képzünk, ugyanis egy gén több ponton reprezentált a chipeken. Esetünkben gcRMA előfeldolgozást, kvantil normalizációt és "median polish" összegzést alkalmaztunk. A próbák eltérő hajlama a nem specifikus kötődésre a háttérintenzitás alábecsléséhez vezethez, ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki a gcRMA előfeldolgozást. A leggyakrabban alkalmazott algoritmusok közül kitűnik felhasználóbarát kialakítása és gyors számítási ideje. Alacsonyabb RNS koncentráció esetében a többi normalizációnál megbízhatóbb eredményt nyújt (Wu és Irizarry 2005).

Microarray esetében a különböző diagnosztikus csoportok között eltérően expresszálódó géneket Significance Analysis of Microarray elemzéssel (SAM) határoztuk meg. Ezzel a statisztikai technikával (SAM 4.0) permutációt végzünk, mellyel azon géneket határozhatjuk meg, melyeknek expresszió változása felelőssé tehető a diagnosztikus csoportok közötti eltérésekért (Tusher et al. 2001). A szignifikáns küszöbérték a fals pozitív arányon alapuló δ érték megválasztásával lehetséges, mellyel az alacsony génexpressziós intenzitású gének nagy eltéréseit korrigálják. Az elemzés végén két meghatározó értéket kapunk, amelyek alapján kiválaszthatóak a legeltérőbb gének. Az első érték a kettes alapú logaritmikus "fold change" (Log₂FC) – a normalizált génexpressziós átlagok különbségét jeleníti meg a két diagnosztikus csoport között – valamint a korrigált nem parametrikus p-érték (az adatok esetleges nem normál eloszlást

követő magatartása miatt), amely a szignifikancia mértékét jelzi. A génexpressziós intenzitás esetében törekedtünk a $Log_2FC \ge 1$ értékhatár betartására. Szignifikancia meghatározásnál minél nagyobb számú nullhipotézist használunk, annál nagyobb annak a valószínűsége, hogy növeljük az elsőfajú hiba jelenlétét. A hamis felfedezési hibaarány kontrollálásához a géneket p-értékeik alapján sorrendbe rendezzük, s egy folyamatosan növekvő küszöbértékhez viszonyítjuk. Benjamini és Hochberg-féle módosított p-értéket (adjusted p-value) vettünk figyelembe (False Discovery Rate - FDR) a vizsgált paraméterek nagy száma miatt, s a szignifikancia szintet minden esetben p<0,05-nél húztuk meg (Benjamini and Hochberg 1995, 2000). Az említett módszer mellett a "nearest shrunken centroid" módszert (Prediction Analysis for miroarrays – PAM) alkalmaztuk a minták génexpressziós klasszifikációja során. A módszerrel olyan részhalmazokat/transzkriptum csoportokat keresünk, amelyek az egyes diagnosztikai csoportokat a legjobban jellemzik (Tibshirani et al. 2002).

A RT-PCR eredmények kiértékelése során a génexpresszió relatív mennyiségi meghatározását végeztük. A fold change értékeléséhez ΔΔCT módszert alkalmaztuk. A célgén expresszió normalizálásához a 18S riboszómális RNS-t alkalmaztuk belső kontrollként (ΔCT).

A feldolgozást, adatbányászatot és statisztikai elemzéseket is R 3.2.1 környezetben végeztük (R Development Core Team 2014), Bioconductor könyvtárak alkalmazásával. Hierarchikus klaszter, diszkriminancia, főkomponens-elemzéseket és logisztikus regressziót alkalmaztunk az egyes betegségcsoportokat legjobban elkülönítő transzkriptumok meghatározására és az elkülönítő képességük tesztelésére. A hierarchikus klaszter elemzés (hőtérkép) egy olyan grafikai megjelenítése az adatoknak, ahol a mátrix minden egyes eleméhez egy színt rendelünk, pl. minél alacsonyabb ez az érték annál zöldebb, minél magasabb annál pirosabb. A hagyományos megjelenítésnél dendrogram illeszkedik mindkét változó hierarchia viszonyainak bemutatására (esetünkben az Affymetrix azonosítók illetve minták kerülnek így bemutatásra), melytől mi eltekintettünk, különböző vizsgálataink jobb összehasonlíthatóságának érdekében. A hőtérképek során a GSE8671 és GSE18105 génexpressziós *in silico* elemzések eredményei is láthatóak (**4. ábra**). A hőtérképeken minden mintacella egy adott színt tartalmaz és a szín intenzitása a gén kifejeződésével arányos, melyet z-érték alapján csoportosít a program, mely megoszlási képet mi az ábrázolás bal alsó sarkában

szerepeltettünk. Kiszámítása esetén transzkriptumonként a minták esetén mért aktuális intenzitás értékből kivonjuk az összes minta átlagos intenzitás értékét, majd a kapott értéket osztjuk az összes minta szórásával.

A főkomponens-elemzés esetében egy olyan dimenzióredukciós módszerről beszélünk, amely a kölcsönös kapcsolatban álló változók dimenzióinak a csökkentésére helyezi a hangsúlyt a jelenlévő variancia megtartása végett. Az adathalmaz korreláltatható változóinak lineárisan korrelálatlan változók értékkészletévé való átalakítása során kapjuk meg az ún. főkomponenseket. Ábrázolása esetén, leggyakrabban a két legnagyobb főkomponens eltérése látható. A főkomponens-elemzés során a GSE8671 és GSE18105 *in silico* génexpressziós vizsgálati eredmények is láthatóak.

A 11 biomarker génexpressziójának összehasonlításához – kettő csoport összehasonlítása esetén – Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk, amely azt vizsgálja, hogy két független mintában – melyek normál eloszlásúak, intervallum vagy arányskálán mértek valamint szórásuk is megegyezik – egy-egy valószínűségi változó átlag szignifikánsan eltér-e egymástól. A p<0,05 kritériumot használtuk szignifikancia meghatározás esetén Benjamini és Hochberg-féle módosítás után mind microarray, mind RT-PCR platformon.

Kettőnél több mintacsoport esetében egyszempontú Anovát alkalmaztunk, melynek során a különböző független csoportok átlagainak varianciáját hasonlítottuk össze, hogy van e közöttük szignifikáns különbség vagy nincs. A p<0,05 kritériumot használtuk szignifikancia meghatározás esetén. Omnibus teszt statisztika, tehát arra nem alkalmas, hogy a csoportok közül jelezze mely csoportok eltérőek. Ennek érdekében post-hoc teszteket alkalmaznak, mint például a Tukey HSD. A teszt az ún. "Honest Significant Difference (HSD)" érték meghatározásán alapul, amelyből a csoportok közötti távolságot lehet meghatározni. A p<0,05 kritériumot használtuk szignifikancia meghatározás esetén.

Az eltérések ábrázolására boxplotokat alkalmaztunk, ami az adatcsoportok grafikai megjelenítési formája kvartiliseik eloszlása alapján. Az ún. boksz terület az adatok 50%-nak megjelenítésért felelős, a felső és alsó kvartiliseket az ún. whiskerek mutatják, ezek 25-25% adatot fednek le normál eloszlás esetében. A középen lévő vonal a boksz területén, a médián értéket jelöli. Amennyiben a whiskereken kívüli adatpont is

látható, abban az esetben outlier-ről beszélhetünk, amely legalább 2 szórásegységnyire esik az átlagtól.

Mind a microarray, mind az RT-PCR sorozat esetében multiple logisztikus regressziót alkalmaztunk a bináris (0-kontrol, 1-beteg állapot) diagnosztikai változók értékeinek maghatározására. A minta "beteg" állapotként való diagnosztizálásának valószínűségét (P) a következő megoldóképlet alkalmazásával végeztük:

 $X = logit(P) = ln (P/(1-P) = b_0 + b_1 \Delta C t_1 + b_2 \Delta C t_2 + + b_n \Delta C t_n$

A "Maximum-likelihood" illeszkedés módszer során (empirikus) olyan együtthatókat {bi} alkalmaztunk, amelyek meghatározzák a kapcsolatot X és a kísérleti mérések között { Δ Ct}. A "Receiving operating characteristic" (ROC) görbe elemzésére Medcalc 12.1 szoftvert alkalmaztuk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a markersorozat elkülönítő hatását. Az elkülönítő képesség megállapításához meghatároztuk a transzkriptumsorozat szenzitivitását és specificitását is.

Interaktív dot diagram a MedCalc szoftver környezetben másodlagos grafikai megjelenítésnél alkalmazható a diagnosztikai pontosság vizsgálatára. Negatív és pozitív csoportok ábrázolhatóak pont megjelenítéssel a vertikális tengelyen. A horizontális vonal a legjobban elkülönítő cut-off értéket adja meg (minimális fals negatív és fals pozitív) két csoport között. A legjobb cut-off értékhez tartozó szenzitivitás és specificitás értékek szintén az ábrázolás jobb oldalán vannak feltüntetve.

Az alkalmazott Younden index a ROC diagnosztikai teszt erejét jelző index érték (Szenzitivitás + Specificitás - 1).

Diszkriminancia elemzést is végeztünk az SPSS 20.0 szoftverrel, melynek során a különböző mintacsoportok elkülönülését vizsgáltuk a markersorozattal. Az osztályozás helyességét és erősségét az ún. Leave-one-out klasszifikációval is ellenőriztük. A kalibrált mintacsoportokat csoportokba osztottuk annak érdekében, hogy megjósolhassuk a különböző csoportokhoz való tartozást. A klasszifikációs eredmények táblázatban a helyesen klasszifikálódott minták aránya, az összes megfigyeléshez viszonyított darabszáma és százaléka is fel lett tüntetve. "Leave-one-out" klasszifikáció kereszt-validációs módszert is alkalmaztunk, melynek során az statisztikai értékelésből visszatartott csoportokkal validáljuk az elkülönülést, majd a végén ezen visszatartott csoportokat összegezzük (McLachlan 2004).

Immunhisztokémiai vizsgálatok esetén az eltérő score értékek mintacsoportonkénti megoszlása esetén Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk adenomadiszplázia-karcinóma szekvencia átmenet során. Ebben az esetben a változók közötti kapcsolat erősségét mérjük, valamint függetlenségüket teszteljük (p<0,05).

5. EREDMÉNYEK

Biopsziás microarray mintasorozatokon lehetőségünk nyílt két eltérő időpontban végzett elemzés összehasonlítására, melyeket, mint "tréning" és független "teszt" mintasorozatként alkalmaztunk. A két mintasorozat ugyanazon a platformon készült (HG-U133 Plus 2.0, Affymetrix), azonban egyes korábban elvégzett microarray elemzések esetében eltérő hibridizációs eljárásokat alkalmaztuk, s így az eredményükben látható kisebb eltérések szisztematikus voltát ennek tudhatjuk be. A microarray elemzések intenzitás értékei logaritmusos normalizációt követően összehasonlíthatóak. Az első lépésben három csoportot (egészséges, adenoma és CRC csoportokat) képeztünk. A minták csoportokba való rendezését követően, SAM és PAM statisztikai próbákat alkalmaztunk a legeltérőbb és legmeghatározóbb transzkriptumok kiválasztására. A SAM minden páros összehasonlításra (egészséges vs. adenoma, egészséges vs. vastagbélrákos, illetve adenoma vs. vastagbélrákos minták) átlagos intenzitás eltérést, valamint szignifikanciát vizsgál. A PAM a legjobb markersorozatot adja meg, a csoportok elkülönítésének szempontjából. Az így kapott eredményeket összevetettük, s a mindkét elemzésben jól szereplő transzkriptumokat elemeztük tovább. A kritériumoknak legmegfelelőbb markereket ezt követően diszkriminancia és logaritmikus regresszió elemzéssel választottuk ki, melyek a legjobban elkülönítik a fent említett három mintacsoportot egymástól. A kapott markereket ezt követően a GEO adatbázisból letöltött mintasorozatokon is megvizsgáltuk annak érdekében, hogy teljesen független mintákon is megerősítsük eredményeiket. Ezekben az esetekben azonban csak páros összehasonlítást tudtunk végezni, mert azonos microarray platformon történő vizsgálatot egyszerre mindhárom diagnosztikus mintacsoporttal még nem végeztek el. A microarray vizsgálatok eredményét eltérő validációs technikával, RT-PCR vizsgálattal is validáltuk. Az eredmények első részében együttesen mutatjuk be a legjobbnak bizonyuló 11 markert annak érdekében, hogy microarray és RT-PCR platformon való alkalmazhatóságukat kiemeljük. A sorozat alkalmazásával minden összehasonlításban megfelelő eltérést sikerült detektálnunk. Az intenzitás adatokat minden egyes mintasorozat esetében külön-külön is feltüntettük (7. táblázat). A táblázatban a mintacsoportok közötti eltérést kettes alapú logaritmusban adtuk meg, a pozitív, illetve negatív eltérés minden esetben az összehasonlítás első tagjához képest van elrendezve. A táblázatban szereplő pozitív számok az ADCS során emelkedő génexpressziót jeleznek, míg a negatív számok csökkenést. Példaként említendő, hogy a CA7 egészséges vs. adenomás minták esetében kapott -6,3-as érték megfelel a 2^{-6,3} értéknek, tehát megközelítőleg 36x egészéges felülexpresszáltságot mutat. A 11 vizsgált transzkriptum, egy esettől – a példában is említett CA7 – eltekintve emelkedett génexpressziót találtunk a benignus és malignus tumorokban az egészséges mintákkal összevetve. Az esetek döntő többségében az eltérések meghaladják az 1-es LogFC értéket, tehát az összehasonlítások zöme, legalább kétszeres expresszió különbséget mutat a természetes számok halmazán. A táblázat csak az általunk elvégzett vizsgálatok eredményeit mutatja, a GEO adatbázisból letöltött adatokon elvégzett vizsgálati eredményeket nem.

Megközelítőleg 58 000 transzkriptum expressziójának egyidejű vizsgálata során a legjobb elkülönítő képességűnek bizonyuló 11 marker (IL8, MMP3, IL1B, CHI3L1, GREM1, IL1RN, CXCL1, CXCL2, CA7, COL12A1 és SLC7A5) egy kivételtől eltekintve (COL12A1) már bizonyítottan részt vesznek a kolorektális karcinogenezisben és a betegség progressziójában. A CHI3L1 és a CXCL1 a karcinogenezissel, az IL8, a CXCL1, az SLC7A5 és az MMP3 a tumor növekedéssel és fejlődésével, az IL8, a CHI3L1 és az SLC7A5 az angiogenezissel és metasztatikus invazióval, az IL8 a túléléssel, valamint az IL1RN és az IL1B a betegség kiújulással hozható összefüggésbe. További vizsgálataink arra is irányultak, hogy ezzel a transzkriptum sorozattal elkülöníthetőek-e a benignus és malignus vastagbéltumor minták (high-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrákos minták).

			Microarray – "tréning" mintasorozat (53)			Microarray – "teszt" mintasorozat (94)			RT-PCR független mintasorozat (68)		
Affymetrix azonosító	Gén szimbólum	Gén név	Log ₂ FC (AD vs. N)	Log ₂ FC (CRC vs. N)	Log ₂ FC (CRC vs. AD)	Log ₂ FC (AD vs. N)	Log ₂ FC (CRC vs. N)	Log ₂ FC (CRC vs. AD)	Log ₂ FC (AD vs. N)	Log2FC (CRC vs. N)	Log ₂ FC (CRC vs. AD)
207504_at	CA7	karbon anhidráz VII	-6,3	-4,9	1,5	-5,4	-5,1	0,2	-5,8	-4,1	1,7
39402_at	IL1B	interleukin-1β	3,4	4,5	1,1	2,2	6,1	3,9	1,7	4,7	3,0
212657_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonista	3,3	4,7	1,4	1,7	5,1	3,4	1,0	3,3	2,3
202859_x_at	IL8	interleukin-8	5,2	6,6	1,4	4,1	9,0	4,8	2,2	4,4	2,2
218469_at	GREM1	gremlin 1	0,2	4,2	4,0	-0,9	3,0	3,9	2,4	4,5	2,1
204470_at	CXCL1	kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1	5,0	5,1	0,1	4,1	6,3	2,2	-0,04	2,7	2,7
209774_x_at	CXCL2	kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 2	4,6	4,1	-0,5	3,7	5,7	2,0	1,1	4,6	3,5
225664_at	COL12A1	XII típusú α1 kollagén	2,5	3,8	1,4	1,4	3,9	2,5	1,0	3,4	2,4
209395_at	CHI3L1	kitináz 3-szerű 1	3,4	5,3	1,9	3,3	6,3	3,0	1,4	6,0	4,6
201195_s_at	SLC7A5	folyadék transzporter család 7, 5. tagja	4,6	4,2	-0,4	3,2	4,7	1,5	1,8	6,3	4,5
205828_at	MMP3	mátrix metalloproteináz 3	8,2	9,7	1,5	4,0	8,4	4,4	1,8	3,2	1,4

7. táblázat: 11 markeres elkülönítő sorozat expresszió változásai a mintasorozatokon.

Elemzéseink során szignifikáns elkülönítést sikerült elérnünk egészséges, adenoma, illetve vastagbélrákos minták között, melyek szemléltetéséhez főkomponens és hőtérkép elemzést alkalmaztunk (**3-4. ábra**). A főkomponens-elemzés eredményei alapján is látszik, hogy a 11 marker együttes alkalmazása mellett a betegségcsoportok kiválóan elkülöníthetőek egymástól, s csak kisszámú minta besorolódása nem megfelelő. A microarray vizsgálatok esetében a mintacsoportok jól karakterizálhatóak (**3/A-B ábra**), amelyet a független RT-PCR-es validálás is megerősített. A markersorozat validálásához a Gene Expression Omnibus adatbázisból olyan, mások által már leközölt microarray elemzéseket töltöttünk le, amelyek alkalmazhatóak az általunk vizsgált stádiumok összehasonlítására. A két GEO adatbázisból letöltött vizsgálat – egészséges vs. adenoma (GSE8671) és egészséges vs. CRC összehasonlítás (GSE18105) – főkomponens-elemzéssel történő elkülönítése is eredményesnek bizonyult a vizsgált 11 markerrel (**3/D-E ábra**). A GSE18105 tanulmány esetében a PCA esetében csak egy hibásan klasztereződő egészséges mintát találtunk (**3/E ábra**).



3. ábra: 11 tagú klasszifikáló sorozat főkomponens-elemzése

A. Tréning mintasorozat (53 minta, microarray) **B.** Teszt mintasorozat (94 minta, microarray) **C.** Független RT-PCR mintasorozat (68 minta, RT-PCR) **D.** GSE8671 (64 minta, microarray) **E.** GSE18105 (111 minta, microarray). n = egészséges, a = adenoma, crc = vastagbélrák. Az, B és C ábrák esetében a színjelzés a következő volt: egészséges - fekete, adenoma - piros, CRC - zöld. D és C ábrák esetében a színjelzés a következő volt: egészséges - fekete.

A 4. ábrán szintén összevontan ábrázoljuk a mintacsoportokat annak érdekében, hogy megjeleníthessük a csoportok közötti eltéréseket minden vizsgálat esetében. Minél zöldebb színjelzést alkalmaztunk egy mintánál, annál csekélyebb, minél pirosabbat, annál magasabb expressziós értéket határoztunk meg. Az ábrák esetében a könnyebb összehasonlítás miatt klasztereket nem szerepeltettünk, mert azok felborították volna a minta és transzkriptum sorrendet. Az ábrák alapján kijelenthetjük, hogy az egészséges minták esetében (fejlécben zöld színnel jelölt) a legtöbb marker csekély expressziós értékkel rendelkezik. Ezen markerek esetében az expressziós értékek folyamatosan emelkednek adenoma (fejlécben világoskék színnel jelölt) és CRC minták (fejlécben sötétkék színnel jelölt) microarray elemzése során (4/A-B ábra). Ezt figyelhetjük meg a független RT-PCR sorozat eredményeiben is (4/C ábra). A két GEO adatbázisból letöltött vizsgálat - egészséges vs. adenoma (GSE8671), és egészséges vs. CRC összehasonlítás – esetében csak két-két mintacsoport összehasonlítása volt lehetséges, azonban így is jól látható, hogy a markerek domináns részénél itt is megfigyelhető az expresszió növekedése a beteg mintákban (4/D-E ábra). A vizsgált markerek esetében egyedül a CA7 expresszálódott erősebben egészséges mintákon, mint a beteg csoportok mintáin (4/A-E ábra), tehát ebben az esetben, az egészséges mintákban a gén felülexpresszálódik.

A transzkriptumok a két *in silico* elemzés esetében eltérő expressziós mintázatot mutathatnak, mivel két mintacsoport összehasonlítását tartalmazzák, szemben az összes mintacsoportot tartalmazó elemzéssekkel. A transzkriptumok génexpressziós változásainak megerősítése ezen *in silico* elemzések esetében nem minden esetben meggyőző és elégséges.

További mintacsoporton (GSE39582) *in silico* vizsgálatot végeztünk, melynek során metilációs fenotípus és mikroszatellita instabilitás eltérést vizsgáltuk. Szignifikáns eltérést a malignus tumorok CIMP+ és CIMP-, valamint MSI és MSS csoportjai között nem találtunk, azonban az egészséges mucosa és tumoros szövetek között minden esetben szignifikáns eltérést tapasztaltunk a vizsgált markerek esetén.



4. ábra: 11 tagú klasszifikáló sorozat hőtérkép elemzése

A. Tréning mintasorozat (53 minta, microarray) **B**. Teszt mintasorozat (94 minta, microarray) **C**. Független RT-PCR mintasorozat (68 minta, RT-PCR) **D**. GSE8671 (64 minta, microarray) **E**. GSE18105 (111 minta, microarray). Minden hőtérképnél egységes színjelzést alkalmaztunk a fejlécnél. n = egészséges (zöld), a = adenoma (világoskék), crc = vastagbélrák (sötétkék). A mátrix esetében az alacsony génexpressziós intenzitás zölddel, a magas génexpressziós intenzitást pirossal jelöltük. A nyers z-értékes megoszlási kép az ábrázolás bal alsó részén látható.

5.1. A marker sorozat azonosítása a "tréning" microarray sorozat mintáin

A "tréning" mintacsoport esetében (53 microarray: 11 egészséges, 20 adenomás és 22 CRC-s minta), a 11 transzkriptumból álló sorozat sikeresen alkalmazható volt a különböző betegcsoportok elkülönítésére. Diszkriminancia elemzés eredménye alapján a minták 96,2%-a a csoportbeosztásnak megfelelően volt besorolható. Amennyiben kereszt-validációt is végeztünk az elemzés során ez az érték 83%-ra módosult (8. táblázat). Az eredeti eredmények alapján két vastagbélrákos minta, az összes mintának 4,5%-4,5%-a, sorolódott át az egészséges és az adenoma csoportokba. A kereszt-validált elemzés esetében egyedül az egészséges minták csoportosultak 100%-ban a megfelelő helyre, vastagbélrákban 81,8%-ra, adenomában pedig 75%-ra módosultak az eredmények. A mintasorozat elkülönítő képességének vizsgálatakor többváltozós logisztikus regressziót is alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során ROC görbe elemzést hajtottunk végre a 11 elkülönítő marker esetén, melyel egészséges és adenoma minták összehasonlításakor 100% specificitást és szenzitivitást határoztunk meg. Egészséges és CRC-s minták esetében a szenzitivitás 95,5%-ra csökkent, azonban a specificitás értéke megmaradt. Ugyanezeket a százalékos értékeket kaptuk adenomás és CRC-s minták összehasonlításakor is (5/A-C ábra). Az ROC elemzés során észlelt elkülönítő képesség erősségének jellemzéséhez Youden-indexet alkalmaztunk, amely 0,955 és 1 között változott.



5. ábra: ROC statisztika eredménye a "tréning" microarray mintasorozat elemein (53 minta) (A-C).

5.2. Markerek vizsgálata a "teszt" microarray mintasorozaton

A "teszt" mintacsoport esetében (94 microarray: 38 egészséges, 29 adenomás és 27 CRC-s minta) a diszkriminancia elemzés eredménye alapján a mintáknak a 93,6%-a a csoportbeosztásoknak megfelelően sorolódott be, melyet a kereszt-validációs elemzés is megerősített, hiszen a minták 91,5% sorolódott megfelelően (**8. táblázat**). Az elemzés alapján összesen négy adenomás és két CRC-s minta besorolódása volt helytelen, ami 86,2%-os és 92,6%-os besorolási megfelelést jelent. Kereszt-validáció során még egy vastagbélrákos minta került az adenomás minták közé, ezáltal 88,9%-ra rontva a CRC-s minták megfelelő csoportba történő besorolódását.



6. ábra: ROC statisztika eredménye a "teszt" microarray mintasorozat elemein (94 minta) (A-C).

A mintasorozat elkülönítő képességének vizsgálatakor többváltozós logisztikus regressziót is alkalmaztunk. A páros összehasonlítások során ROC görbe elemzés alapján egészséges és vastagbélrákos minták összehasonlításakor 100%-os szenzitivitást és specificitást figyeltünk meg. A markerek alkalmazása során egészséges és adenomás beteg minták összehasonlításakor 100% specificitást és 96,6% szenzitivitást kaptunk. Benignus adenoma és malignus CRC-s colon minták összehasonlítása során a specificitás moderáltabb (89,7%), azonban a szenzitivitás (100%) kiváló értéket mutatott (**6/A-C ábra**). Az ROC elemzés során észlelt elkülönítő képesség erősségének jellemzéséhez Youden-indexet alkalmaztunk, amely 0,89 és 1 között változott.

5.3. GEO adatbázis mintasorozatainak vizsgálata

A GSE8671 azonosítójú elemzésbe 32-32 egészséges és adenomás mintát vontak be. A vizsgálataink során azonosított 11 transzkriptum alkalmazásával a 32 adenomás és 32 egészséges független biopsziás minta 100%-os specificitással és szenzitivitással bizonyult elkülöníthetőnek. További in silico vizsgálatainkban 94 CRC-s és 17 egészséges szövetmintát hasonlítottunk össze (GSE18105 tanulmány). Az általunk azonosított 11 transzkriptum alkalmazása 100%-os specificitást és szenzitivitást eredményezett a fenti független CRC-s és egészséges minták összehasonlításakor. Mindkét esetben meggyőződhettünk arról, hogy vizsgált mintacsoportok páros összehasonlítása során a marker sorozat kiválóan teljesít. További in silico vizsgálatunk során, a marker sorozat metilációs fenotípus és mikroszatellita specifikusságának megléte, illetve hiányának vonatkozásában kerestük a választ. A GSE39582 azonosítójú tanulmány esetében a kiválasztott 19 egészséges mucosa minden esetben szignifikáns eltérést (p<0,01) mutatott vastagbéltumoros minták esetében, s génexpressziós eltérésük iránya is megegyezett a "tréning", illetve "teszt" mintasorozatoknál tapasztaltakkal. A mikorszatellita és metilációs fenotípusos minták egymás között szignifikáns eltérést nem mutattak a 24 CIMP- és 13 CIMP+ és 14 MSI és 22 MSS vastagbélrák mintájának összehasonlítása során.

5.4. A markerek vizsgálata a független RT-PCR mintasorozaton

Az RT-PCR vizsgálatokat a 11 potenciális biomarker esetében független biopsziás mintákon végeztük el. A mintasorozat esetében (68 RT-PCR minta: 20 egészséges, 24 adenomás és 24 CRC-s minta) housekeeping génnek a legkisebb ΔCT szórással rendelkező 18S riboszomális RNS-t válaszottuk ki a 7 potenciális háztartási gén közül. A 11 marker együttes vizsgálatakor a diszkriminancia elemzés a minták 95,6%-át sorolta be helyesen, keresztvalidáció során pedig 94,1% volt ez az érték. A csoportok esetében való átsorolódást a táblázat tartalmazza (**8. táblázat**). Logisztikus regressziót követően csak páros összehasonlításokat vizsgáltunk: a ROC elemzés 100% szenzitivitást és specificitást mutatott egészséges és CRC-s minták esetén. Egészséges és adenomás minták összehasonlítása során 95,8% szenzitivitást és 95% specificitást határoztunk meg. Hasonlóan jó értékeket kaptunk benignus adenoma és malignus CRCs colon minták összehasonlítása során is, hiszen 95,8% szenzitivitással és 100%

specifitással különült el a két mintasorozat. A ROC elemzés során észlelt elkülönítő képesség az erősségére Youden-indexet határoztunk meg, amelynek értéke 0,958 és 1 között változott. A független RT-PCR értékek szenzitivitás és specificitás értékeihez a későbbiek folyamán visszatérünk, mert a betegek utánkövetése során átsorolódásokat tapasztaltunk, és ezek a markersorozat elkülönítő képességét növelték.

8. táblázat: 11 marker diszkriminancia elemzés eredményei mintasorozatok alapján szétválasztva. Az eredeti számítás és keresztvalidációs megközelítés alapján a mintaszámok mintacsoportokba való besorolódása látható, melyet százalékban is kifejeztünk.

			"tréning" mintasorozat (n=53) microarray				"tesz	"teszt" mintasorozat (n=94) microarray				Független mintasorozat (n=68) RT-PCR			
			Egészséges	Adenoma	CRC	Összesen	Egészséges	Adenoma	CRC	Összesen	Egészséges	Adenoma	CRC	Összesen	
Eredeti számítás	Minta szám	Egészséges	11	0	0	11	38	0	0	38	20	0	0	20	
		Adenoma	0	20	0	20	2	25	2	29	1	22	1	24	
		CRC	1	1	20	22	0	2	25	27	1	0	23	24	
	%-os érték														
		Egészséges	100	0	0	100	100	0	0	100	100	0	0	100	
		Adenoma	0	100	0	100	6,9	86,2	6,9	100	4,2	91,7	4,2	100	
		CRC	4,5	4,5	90,9	100	0	7,4	92,6	100	4,2	0	95,8	100	
Kereszt- validált	Minta szám	Egészséges	11	0	0	11	37	0	1	38	20	0	0	20	
		Adenoma	2	15	3	20	2	25	2	29	1	21	2	24	
		CRC	1	3	18	22	1	2	24	27	1	0	23	24	
	%-os érték														
		Egészséges	100	0	0	100	97,4	0	2,6	100	100	0	0	100	
		Adenoma	10	75	15	100	6,9	86,2	6,9	100	4,2	87,5	8,3	100	
		CRC	4,5	13,6	81,8	100	3,9	7,4	88,9	100	4,2	0	95,8	100	

5.5. High-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrákos minták összehasonlítása

A "tréning" mintasorozat esetén a 11 elemből álló markerszet alkalmazása során a high-grade diszpasztikus adenomás (n=11) és korai vastagbélrákos (n=10) biopsziás minták jól elkülöníthetőek voltak (specificitás: 90,9%, szenzitivitás: 100%). A független "teszt" mintasorozat esetén a high-grade diszplasztikus adenomás (n=13) és a korai vastagbélrákos (n=14) biopsziás mintákat 92,3%-os specificitással és 100%-os szenzitivitással különítettük el. Az ábrázoláshoz a két microarray mintasorozatot összevontan kezeltük, melynek során összesen 24 high-grade diszplasztikus adenoma és 24 korai CRC (Dukes' A vagy B stádiumú) minta elemzését végeztük el, 83,3%-os specificitást és 100%-os szenzitivitást érve el (7/A ábra). A csökkent mértékű specificitás a szintéziséhez és fragmentálásához alkalmazott eltérő kitekre is visszavezethető. Hasonlóan magas specificitás és szenzitivitás értékeket kaptunk az RT-PCR vizsgálat során is, amelyben összesen 11 high-grade diszplasztikus adenomás és 10 korai CRC-s minta szerepelt. A hierarchikus cluster elemzés eredménye alapján a 10 korai CRC-s minta megfelelő diagnosztikai csoportba sorolódott, míg három adenomás minta (a 6-os, a 10-es és a 11-es sorszámú) tévesen átsorolódott az adenomás csoportból a CRC-s mintacsoportba (7/C ábra). A betegek esetében végzett utánkövetés ("Medsol" kórházi informatikai rendszerben való keresés, valamint patológiai szakvélemény) azonban rávilágított arra, hogy a 6-os és 11-es jelölésű minta in situ karcinómának bizonyult az újabb mintavétel után (17/D, E ábrák). A független RT-PCR validáció során a high-grade diszplasztikus adenomás (n=11) és korai CRC-s (n=10) biopsziás minták 90,9%-os specificitással és 100%-os szenzitivitással különültek. Az ábrán piros színnel jelöltük azokat a mintákat (6-os és 11-es jelű adenoma), melyek a páciensek utánkövetését megelőzően a threshold fölött vagy ahhoz nagyon közel helyezkedtek el. Zöld színnel jelöltük azt az adenomás mintát (10-es jelű adenoma), amely a CRC-s mintákkal együtt klasztereződött a hierarchikus cluster elemzés során, azonban a ROC statisztika szemléltetése során egyértelműen a többi high-grade diszplasztikus adenomához állt közel (7/B, D ábra). Az utánkövetés eredményeképpen a pirossal jelölt két adenomás minta a CRC csoportba került, ezért a ROC statisztika esetében új logisztikus regresszió képlet számítását tartottuk fontosnak, tehát megismételtük az elemzést az új csoportosítással is.

Az új elemzés során 9 high-grade diszpláziás adenomás és 12 korai CRC-s mintát hasonlítottunk össze, amely 100%-os szenzitivitást és specificitást (**7/D ábra**) eredményezett, tehát jobb eredményt mutatott a korábbi szenzitivitás (100%) és specificitás (90,9%) eredményeknél, amelyet az átrendezés előtt kaptunk (**7/B ábra**). Táblázatos formában a **9. táblázat** mutatja az átsorolódó minták számát és százalékos megoszlását diszkriminancia elemzése során. A 11 marker közül minden marker esetében egyesével is megnéztük a high-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrák összehasonlítást is, amelyek eredményét a **Melléklet II.** fejezetben külön-külön is feltüntettünk. Az összehasonlításban a két microarray mintasorozat közös eredményét szemléltetjük az első boxploton, a RT-PCR mintasorozatot a második, a két microarray mintasorozat eredményét a harmadik és negyedik boxploton.



7. ábra: High-grade diszplasztikus adenomás és korai CRC-s minták elkülönítése a 11 markeres sorozattal. **A.** Microarray eredmények interaktív dot diagramja, **B.** Real-time PCR eredmények interaktív dot diagramja, **C.** RT-PCR hőtérképe, **D.** Utánkeresés követő változtatások az RT-PCR eredményein, **E.** Utánkeresés követő változtatások az RT-PCR eredményein, Hőtérképen; Adenoma HGD: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC: kolorektális karcinóma

9. táblázat: 11 marker diszkriminancia elemzés eredményei high-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrák minták összehasonlítása során, minden mintasorozaton. Az eredeti számítás és keresztvalidációs megközelítés alapján a mintaszámok mintacsoportokba való besorolódása látható, melyet százalékban is kifejeztünk.

			Egyesített	microarray min (n=48)	tasorozat	RT-PCR	független mintas (n=21)	orozat	RT-PCR független mintasorozat (n=21)			
				microarray		minta	utánkövetése ele	őtt	minta utánkövetése után			
			Adenoma (HGD)	Korai vastagbélrák	Összesen	Adenoma (HGD)	Korai vastagbélrák	Összesen	Adenoma (HGD)	Korai vastagbélrák	Összesen	
Eredeti számítás	Mintaszám	Adenoma (HGD)	20	4	24	10	1	11	9	0	9	
		Korai vastagbélrák	2	22	24	1	9	10	0	12	12	
	%-os érték	Adenoma (HGD)	83.3	167	100	00.0	0.1	100	100	0	100	
		(IIGD) Korai vastagbélrák	8,3	91,7	100	10	90	100	0	100	100	
Kereszt- validált	Mintaszám	Adenoma (HGD)	19	5	24	8	3	11	7	2	38	
		Korai vastagbélrák	3	21	24	3	7	10	1	11	29	
	%-os érték	Adenoma (HGD)	79,2	20,8	100	72,7	27,3	100	77,8	22,2	100	
		Korai vastagbélrák	12,5	87,5	100	30	70	100	8,3	91,7	100	

5.6. A 11 potenciális biomarker változásai mintacsoportonként

A 11 marker egyenkénti összehasonlítását biopsziás mintákon a következő ábrákon mutatjuk be. Minden esetben szerepeltettük a "tréning"-, a "teszt" microarray, valamint RT-PCR intenzitás értékeket egészséges, adenomás és CRC-s mintákon. További microarray vizsgálatok is bemutatásra kerülnek lézer mikrodiszekált hám és stróma mintákon annak érdekében, hogy további vizsgálatokat végezhessünk annak kiderítésére, vajon a transzkriptumok a hámban vagy a strómában mutatnak eltérő expressziót a vizsgált mintacsoportoknál. Minden esetben ANOVA vizsgálatot végeztünk, hogy meghatározzuk, van-e szignifikáns eltérés a csoportok között. A Tukey-HSD post-teszt esetében pedig a szignifikáns eltérés csoportonkénti összehasonlítását végeztük el. A "tréning" microarray mintasorozat esetében más kitet alkalmaztunk a szintéziséhez és fragmentálásához, mint a "teszt" microarray mintasorozat esetében, részben ennek tudható be az adenomás mintacsoport és CRC-s mintacsoport eltérő egyezése. Ez az eltérés a biotinált cRNS próbák szintéziséhez és fragmentálásához alkalmazott eltérő kit-ek miatt következhetett be, a korábbi kit beszüntetése miatt új kit került alkalmazásra. A vizsgált gének esetében a "tréning" microarray sorozatnál megfigyelhető, hogy az adenomás minták magasabb intenzitásértékekkel rendelkeznek és szignifikáns eltérés nem figyelhető meg az adenomás és CRC-s minták között, holott ez megfigyelhető a "teszt" és az RT-PCR mintasorozatok esetében. A boxplotok esetében mindenhol a csillaggal jelölt összehasonlításban jelenítjük meg a szignifikáns eltéréseket a mintacsoportok között. Majdnem az összes transzkriptum esetében megfigyelhető, hogy a korábbi "tréning" mintasorozatnál az adenomás és vastagbélrákos mintacsoportok egymáshoz közelebb helyezkednek el. Ezek a szisztematikus eltérések, véleményünk szerint, az eltérő kitek alkalmazásának következménye.



8. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 201195_s_at (SLC7A5) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

Az SLC7A5 esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és kolorektális karcinóma mintáit leszámítva szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlítások esetében látható, hogy a hám esetében a CRC-s mintacsoport, míg stróma esetében az adenomás csoport tér el a másik két mintacsoporttól. A vastagbélrákos mintacsoport az összes összehasonlításban magasabb expresszió változást mutat (**8. ábra**).



9. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 202859_x_at (IL8) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

Az IL8 esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és kolorektális karcinóma, valamint a RT-PCR sorozat egészséges és adenoma mintáinak összehasonlítását leszámítva szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,05). Az LCM microarray összehasonlítások esetében nem figyelhető meg eltérés, azonban mind a hám, mind a stróma mintacsoport esetében a trend hasonló a fagyasztott minták változásához (**9. ábra**).



10. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 204470_at (CXCL1) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

A CXCL1 esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és vastagbélrákos mintáinak összehasonlítását leszámítva szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlítások esetében a hám mintáknál nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a mintacsoportok között, viszont a trend hasonló volt a fagyasztott mintákon végzett elemzések trendjéhez. A stróma esetében a vastagbélrákos csoport eltért a másik két mintacsoporttól. A kolorektális karcinóma mintacsoport mindkét LCM vizsgálatban emelkedettebb expresszióval rendelkezik (**10. ábra**).



11. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 205828_at (MMP3) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

Az MMP3 esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és kolorektális karcinóma mintái, valamint az RT-PCR eredmények esetében az egészséges és adenomás minták összehasonlítását leszámítva szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlítások során, a hám minták esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a mintacsoportok között, valamint a trend sem hasonló a fagyasztott mintákon végzett elemzések trendjéhez. A stróma esetében a CRC mintacsoport eltért a másik két mintacsoporttól. A vastagbélrákos mintacsoport mindkét LCM vizsgálatban magasabb expresszióval rendelkezik, mely megerősíti a fagyasztott mintákon kapott eredményeket, azonban LCM stróma esetében az adenomás minták alacsonyabb expressziós értékekkel rendelkeztek, mint az egészséges minták (**11. ábra**).



12. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 207504_at (CA7) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb alsó sarokban csillaggal jelöltük.

A CA7 esetében az egészséges minták magasabb intenzitás értékekkel rendelkeznek, mint a másik két csoport mintái, szignifikáns eltérés figyelhető meg (p<0,01). A "teszt" mintasorozat esetében az adenoma és kolorektális karcinóma minták összehasonlítása között nincs szignifikáns különbség. Az LCM microarray összehasonlítások során, a hám minták esetében az egészséges minták eltérnek a másik két mintacsoporttól, az egészséges mintacsoport itt is magasabb expressziós értékkel rendelkezik, mint a fagyasztott minták esetén. A stróma minták esetén a mintacsoportok között nincs eltérés (**12. ábra**).



13. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 209395_at (CHI3L1) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

A CHI3L1 esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: szignifikáns eltérés tapasztalható minden mintasorozaton belül (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlításoknál a hám és a stróma esetében eltérés figyelhető meg az egészséges és vastagbélrákos mintacsoportok között. Mind a hám, mind a stróma esetében hasonló trend figyelhető meg a fagyasztott mintákon végzett elemzések trendjéhez. A vastagbélrákos minták minden esetben magasabb expressziós értékekkel rendelkeznek (**13. ábra**).


14. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 209774_x_at (CXCL2) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

A CXCL2 esetében folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és vastagbélrákos mintáinak összehasonlítását leszámítva szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,05). Az LCM microarray összehasonlításoknál nem figyelhető meg eltérés sem a hám, sem a stróma mintasorozat esetében. Az LCM hám esetében a trend hasonló a fagyasztott mintáknál végzett elemzések trendjéhez (**14. ábra**).



15. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 212657_s_at (IL1RN) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

Az IL1RN esetében a "tréning" mintasorozatnál az egészséges mintacsoport szignifikánsan eltér a másik két mintacsopottól (p<0,01). A "teszt" mintasorozat esetében az összes mintacsoport szignifikáns eltérést mutat (p<0,05). RT-PCR mintasorozat esetében a vastagbélrákos mintacsoport tért el szignifikánsan a másik két csoporttól (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlítások esetében eltérés csak a hám mintasorozat esetében figyelhető meg az egészséges és adenomás mintacsoport között. A megfigyelt trend eltérő a fagyasztott mintákon tapasztaltaknál, mivel az egészséges mintacsoport expressziós értékei magasabbak az LCM hámnál (**15. ábra**).



16. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 218469_at (GREM1) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

A GREM1 esetében az egészséges és adenoma mintacsoportok egyik mintasorozat esetében sem mutatnak szignifikáns eltérést, azonban a vastagbélrákos minták mindhárom esetben megemelkedett, szignifikáns expresszió változást mutatnak mind egészséges, mind adenomás mintacsoportok ellenében (p<0,01). Az LCM microarray összehasonlítások során eltérés csak a stróma mintasorozat esetében figyelhető meg a kolorektális karcinóma mintacsoport esetén. A megfigyelt trend hasonló a fagyasztott mintákon megfigyelteknél, mivel a CRC mintacsoport expressziós értékei magasabbak mind a hám, mind a stróma mintasorozatnál (**16. ábra**).



17. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 225664_at (COL12A1) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

A COL12A1 esetében folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: mindhárom mintasorozat során szignifikáns eltérés van a három mintacsoport esetében (p<0,05). A CRC mintacsoport esetében figyelhetőek meg a legmagasabb expressziós értékek. Az LCM microarray vizsgálatok során eltérés mind a hám, mind a stróma mintasorozat esetében megfigyelhető a kolorektális karcinóma mintacsoport esetén. A hám és stróma mintasorozat esetében a trend hasonló a fagyasztott mintáknál végzett elemzések trendjéhez (**17. ábra**).



18. ábra: A vizsgálatban szereplő minták, 39402_at (IL1B) azonosítójának intenzitás értékei, microarray és RT-PCR (45-dCT) technikák esetén. N: egészséges, Ad: adenoma, CRC: kolorektális karcinóma minták. Mintacsoportok közötti szignifikáns eltérést microarray és RT-PCR vizsgálatok esetében a jobb felső sarokban csillaggal jelöltük.

Az IL1B esetében egy folyamatosan növekvő expresszió változás figyelhető meg: a "tréning" sorozat adenoma és kolorektális karcinóma mintáit, valamint az RT-PCR eredmények esetében az egészséges és adenomás minták összehasonlítását leszámítva, szignifikáns eltérés tapasztalható a mintacsoportok között (p<0,05). Az LCM microarray vizsgálatoknál eltérés sem a hám, sem a stróma mintasorozat esetében nem figyelhető meg. A fagyasztott mintáknál végzett elemzések trendjéhez hasonló trend nem figyelhető meg (**18. ábra**).

5.7. Fehérjeszintű validáció szövet microarray (TMA) rendszeren

5.7.1. Fehérje expressziós vizsgálatok

Fehérje expressziós vizsgálataink során szöveti microarray-ken (Tissue Microarray/TMA) immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A TMA-k egészséges (n=10-12), adenoma (37-64) és vastagbélrákos (13-30) szöveti mintákat tartalmaztak. A potenciális fehérjemarkerekhez egyedi antitesteket választottunk. Az mRNS vizsgálataink alapján hét fehérjemarker esetében tudtunk sikeres reakciót indítani (CA7, COL12A1, IL8, MMP3, SLC7A5, CXCL1-2-3, IL1RN). Az immunhisztokémiai reakciókat empirikus score rendszer segítségével értékeltük. Az antitestek vizsgálata során a mintaszámokban nagyfokú eltérés mutatkozott (leázás miatt).

Karbon anhidráz 7 (CA7). A fehérje expresszióját megfelelően orientált egészséges (n=12), adenoma (tubuláris és tubullovillosus; n=64) és CRC (n=23) minták hámrétegében vizsgáltuk. Az egészséges mintákban a CA7 expresszió a felszíni hámban volt a legintenzívebb (jellemző empirikus score érték: +2), és a kripta bázisa felé folyamatos csökkenést mutatott (**19/A ábra**). Adenomában csökkent, pontszerű expressziós mintázatot figyeltünk meg a hámsejtek apikális felszínén. Jellemző volt a közepesen erős (+1 score érték, ~71%) és a gyenge intenzitású immunreakció (0 score érték, ~18%; **19/B ábra**). Ez az expressziós mintázat a karcinómák egy részében is jellegzetes volt (+1 score érték, ~65%), azonban a gyenge, diffúz citoplazmális fehérje kifejeződés is megfigyelhető volt (0 score érték, ~34%; **19/C ábra**).



19. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm. A hám CA7 expresszió változása a vastagbél adenoma-karcinóma szekvencia során. Egészséges mintákban a CA7 festődése a luminális felszíni felé erősödött (A). Adenomában (B) és karcinómában (C) közepesen erős/gyenge protein expressziót láttunk.

XII típusú α1 kollagén (COL12A1). Vizsgálatainkba egészséges (n=12), adenoma (tubuláris és tubullovillosus, n=44) és CRC-s (n=34) mintákat vontunk be. Egészséges minták esetén a diffúz hámexpresszió kismértékű volt, nem lépte túl az enyhe pozitivitás szintjét (0 illetve 1-es score érték; **20. ábra**). Adenomában és karcinómában a COL12A1 hámexpressziója ugyancsak elenyésző volt. Az adenoma-karcinóma szekvencia során a strómában fokozódó expressziót figyeltünk meg. Az egészséges mintákhoz képest (**20/A ábra**) adenomában (**20/B ábra**) fokozott COL12A1 expressziót találtunk, továbbá vastagbélrákban a stromális sejtek COL12A1 termelése kifejezetten erős volt (**20/C ábra**). Az egészséges és adenoma minták gyenge illetve közepes erősségű score értékekkel rendelkeztek (~60%/~40% megoszlásban). Karcinóma esetében ~75%-ban erős festődést figyeltünk meg.



20. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm. A COL12A1 stromális expressziójának változása az adenoma-karcinóma szekvencia során. Egészséges mintákban a COL12A1 leginkább a subepitheliális régióra korlátozódott (A). Adenoma mintákban a strómában erősödő expressziót figyeltünk meg (B), amely karcinómába kifejezetten erőssé vált (C).

Interleukin 8 (IL8). A vizsgálatba egészséges (n=12), adenoma (tubuláris és tubullovillosus képletek; n=41) és vastagbélrákos (n=20) mintákat vontunk be. Az IL8 esetünkben az irodalmi adatokkal összehasonlítva (Grimm et al. 1996) erős festődést mutatott. Cacev és mtsai. csupán a vastagbélrákok 46,3%-ánál állapítottak meg IL8 pozitivitást. Az IL8 expressziót a rosszul differenciált daganatokkal hozták összefüggésbe (Cacev et al. 2008). Ép mintában a hámsejtek bazális és a kehelysejtek apikális gyenge, diffúz citoplazmatikus festődése mellett sejtmag pozitivitást is találtunk (**21/A ábra**). Az egészségesekhez képest az adenoma hámban kismértékű immunpozitivitás növekedése volt megfigyelhető (**21/B ábra**). Kolorektális karcinóma minták esetében közepesen erős/erős magfestés, illetve az adenománál erősebb citoplazmatikus festődés volt látható (**21/C ábra**).



21. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μ m. A hám IL8 expressziójának változása a vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia során. A egészséges mintákban gyenge, diffúz citoplazma festődés mellett a mag pozitivitása is megfigyelhető volt (**A**). Az adenoma hám mérsékelten magasabb IL8 expressziót mutatott az egészséges hámnál (**B**). CRC esetében közepesen erős/erős magfestés, illetve az adenománál valamivel erősebb citoplazmatikus festődés volt látható (**C**).

Mátrix metalloproteináz-3 (MMP3). A vizsgálatba egészséges (n=12), adenoma (tubuláris és tubullovillosus képletek; n=18) és kolorektális karcinóma (n=15) mintákat vontunk be. Az MMP3 diffúz, citoplazmatikus hámpozitivitást mutatott az adenomakarcinóma szekvencia minden szövettani állapotában. Jeffery et al. az MMP3 kismértékű expresszióját írta le egészséges vastagbél hámszövetben (Jeffery et al. 2009), amit vizsgálataink során mi is tapasztaltunk (gyenge MMP3 expresszió: A), azonban ez nem mindig volt egyértelmű (esetenként erős fehérje expresszió mutatkozott az egészséges hámban). Adenomában az MMP3 termelés kismértékű emelkedését figyeltük meg, ám néhány esetben a festődés kifejezetten erős volt (nem tapasztaltunk összefüggést a diszplázia mértékével) (22/B ábra). CRC esetében a citoplazmatikus MMP3 expresszió heterogenitást mutatott, legtöbbszőr erős (22/C ábra), elvétve közepesen erős volt. Egészséges strómában néhány sejt gyenge pozitivitást mutatott, míg adenomában és karcinómban a strómális sejtek nagy százaléka közepesen erős/erős festődést mutatott.



22. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm. Mátrix metalloproteináz-3 (MMP3) expresszió változása a vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia során. Egészséges hámban, a legtöbb esetben az MMP3 kismértékű, gyakrabban közepes expressziója volt megfigyelhető (A). Adenomában a hámsejtek MMP3 termelésének emelkedését figyeltük meg (közepesen erős/erős expresszió) (B). CRC esetében a citoplazmatikus MMP3 expresszió legtöbbszőr erős volt (C).

Folyadék transzporter család 7, 5. tagja (SLC7A5). A vizsgálatba egészséges (n=10), adenomás (tubuláris és tubullovillosus képletek; n=37) és CRC (n=13) mintákat

vontunk be. Az SLC7A5 immunhisztokémiai vizsgálata vastagbélben még nem történt meg. Más hámszövetekben diffúz citoplazma festődést mutat, esetünkben a citoplazma festődés mellett membránfestődés is látható. Az egészséges mintákban gyenge/közepes (0 és +1 score értékek) erősségű diffúz citoplazma festődést találtunk (**23/A ábra**). A legtöbb adenomában a citoplazma festődés erősebbé vált (jellemző score érték: +1~55%-; **23/B ábra**). Vastagbélrákban a festődés intenzitása hasonló volt az adenomákéhoz, azonban néhány esetben kifejezetten erős plazma festődést láttunk (jellemző score érték: +2; ~80%), és néhol a membránfestődés is megjelenik (**23/C ábra**).



23. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μ m. Az SLC7A5 immunreakció a vastagbél adenoma-karcinóma szekvencia során. Az egészséges mintákban gyenge/közepes erősségű, diffúz citoplazma festődést tapasztaltunk (**A**). A legtöbb adenomában a citoplazma festődés erősebbé vált (**B**). Vastagbélrákban a festődés intenzitása általánosságban hasonló volt az adenomákéhoz, azonban néhány esetben kifejezetten erős citoplazmatikus festődés volt látható (**C**).

Kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1, 2 és 3 (CXCL1,-2,-3). A vizsgálatba egészséges (n=12), adenomás (tubuláris és tubullovillosus képletek; n=58) és CRC (n=30) mintákat vontunk be. A CXCL -2, -3 növekedő expresszióját (gén szinten) már leírták vastagbélrákban, ez a tanulmány azonban nem vizsgálta a protein expressziót (Doll et al. 2010). A fehérje hámbeli expressziója egészséges mintákban enyhe, diffúz citoplazmatikus (24/A ábra), amely elsősorban a kehelysejtek citoplazmájának apikális

részén mutatkozik (jellemző score érték: +1). Mind adenomában (**24/B ábra**), mind vastagbélrákban (**24/C ábra**) a citoplazmatikus expresszió láthatóan erősebb lett és sejtmagpozitivitás is megjelent. Az adenoma és vastagbélrák közt szemmel nehezen volt megítélhető a különbség (+1 és +2 score értékek egyaránt jellemzőek voltak).



24. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm. Kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1 és 2 (CXCL1-2). A CXCL1,-2 expresszió változása a vastagbél adenoma-karcinóma szekvencia során. Az egészséges minták gyenge/közepes citoplazmatikus expressziót mutatnak (**A**). Adenomában és karcinomában a hám fehérje expressziója megnő (**B**, **C**).

Interleukin 1 receptor antagonista (IL1RN). A vizsgálatba egészséges (n=10), adenomás (tubuláris és tubullovillosus képletek; n=39) és kolorektális karcinóma (n=18) mintákat vontunk be. Az interleukin 1 receptor antagonisa lokalizációja a sejten belül szövetenként eltérő lehet. Metszeteinkben a hámsejtek diffúz citoplazma festődést mutattak, a strómasejtekben citoplazma festődés mellett a magfestődés is megjelent. Egészséges morfológiájú metszeteken a hámsejtekben erős citoplazma festődés látható (25/A ábra). A hámsejtek IL1RN festődése csökkent adenomás (25/B ábra) és CRC hámban (25/C ábra) is, amit a diszplasztikus és egészséges hámot is tartalmazó mintafestődés is megerősít (25/B ábra).



25. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 15x nagyítás, lépték: 100 μ m. A hám IL1RN expressziója a vastagbél adenoma-karcinóma szekvenciában. Egészséges hámban erős/közepesen diffúz fehérje expressziót találtunk (**A**). Adenomában (**B**) és karcinomában (**C**) is ellentmondó eredményeket kaptunk. A **B** minta alapján feltételezhető, hogy az IL1RN expresszió csökken az adenoma-karcinóma szekvencia során.

5.7.2. Az MMP3 és a CXCL1 fehérje expresszió adenomás és vastagbéltumoros mintákban

Az említett microarray mintasorozatokon további génexpressziós vizsgálatok keretében alkalmazott 26 potenciális ADCS-specifikus transzkriptum fehérjeszintű validációs elemzését is elvégeztük szöveti microarray rendszeren. Összesen 35 egészséges, 75 adenomás (37 low-grade diszplasztikus és 38 high-grade diszplasztikus adenoma), valamint 58 vastagbélrákos (29 Dukes' A-B, 29 Dukes' C-D stádiumú CRC) mintát elemeztünk (Sipos et al. 2014).

Az ADCS átmenet során a vizsgált antitestekből összesen 11 antitest mutatott valamilyen kapcsolatot, viszont a dolgozatban csak az MMP3 és CXCL1-GRO antitestek eredményeit mutatjuk be, mivel ezek együttes alkalmazása bizonyult a legjobb elkülönítő markersorozatnak. A score-értékek alapján az adenoma-CRC átmenet nyomonkövethető CXCL1-GRO antitest esetében mind epithéliumban, mind lamina propriában, MMP3 esetében csak a lamina propriában (**10. táblázat**).

10. táblázat: Kiválasztott fehérje markerek mintamegoszlása score értékek alapján a normál-adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia során (epithélium, lamina propria).

		Score	Normal	Adenoma	Diszplasztikus adenoma	CRC-AB	CRC-CD
		-2	0	0	0	0	0
RO	d w	0	33	30	31	3	0
	min	1	0	4	4	24	17
¥	Lai	2	2	0	0	0	0
H	Epithelium	-2	0	0	0	0	0
X		0	0	13	4	2	0
5		1	33	19	27	1	0
		2	2	2	4	24	17
	Lamina p	-2	35	34	35	1	0
		0	1	1	0	26	25
3		1	0	0	0	0	0
MMP		2	0	0	0	0	0
	elium	-2	33	35	35	27	25
		0	0	0	0	0	0
	19	1	0	0	0	0	0
	E_{D}	2	0	0	0	0	0

A jó- és rosszindulatú daganatos szövetminták elkülönítése klinikailag fontos feladat. Fisher-egzakt teszt eredménye alapján a lamina propriában mutatott expressziója esetében az MMP3 szignifikáns különbséget mutat (p<0,001) az adenoma-karcinóma átmenet során. A marker már önmagában is elengendő arra, hogy 98,2%-os

bizonyossággal elkülönítse a benignus és malignus mintákat. Hasonlóan erős elkülönítő markernek bizonyult – mind hámban, mind lamina propriában kifejeződő – CXCL1 is, amelyet az MMP3-al kombinálva kimagasló elkülönítő képességet tapasztaltunk (**26. ábra**). Az immunhisztokémia eredménye a **27. ábrán** látható.



26. ábra: MMP3 és CXCL1 expresszió adenomás és vastagbél tumoros mintákban. Az Y-tengelyen a score értékek láthatóak (-2, 0, 1 és 2). Az X-tengelyen benignus és malignus tumorminták vannak feltűntetve. Lamina propria esetében sárga (MMP3), illetve kék színnel (CXCL1-GRO), az epithélium esetében rózsaszínnel (CXCL1-GRO) score változása követhető nyomon a két mintasorozatnál.

Az immunhisztokémiai képen látható, hogy az MMP3 fehérje expressziója az adenoma-karcinóma átmenet során erősödött (**A-B**). A CXCL1 fehérje immunreakció vastagbélrákban erősebb volt (**D**) mint adenomában (**C**). A digitális mikroszkóp képeket 20x nagyításon 100 μm léptékkel végeztük el.



27. ábra: Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm. MMP3 és CXCL1 fehérje expresszió adenomás és vastagbélrákos (lamina propria) minták esetében (A-B: MMP3; C-D: CXCL1).

Összesen 133 benignus és malignus colon minta esetében 113 esetében kaptunk értékelhető expressziót. A két marker együttes diszkriminancia elemzésének eredménye alapján az adenoma minták 98,6%-a (n=68), valamint a CRC minták 97,7%-a (n=43) megfelően klasszifikálható volt. Mindkét csoport esetében 1-1 minta diagnosztikus csoportba történő besorolása volt helytelen (**11. táblázat**).

			Csoporthoz (be	Összesen	
		Minták	Adenoma	CRC	1
	Mennyiség	Adenoma	68	1	69
Enadati		CRC	1	43	44
Eredeti	Százalék	Adenoma	98,6	1,4	100
		CRC	2,3	97,7	100
	Mennyiség	Adenoma	68	1	69
Kereszt- validált		CRC	1	43	44
	Százalék	Adenoma	98,6	1,4	100
		CRC	2,3	97,7	100

11. táblázat: Diszkriminancia elemzés eredménye (Adenoma vs. CRC)

High-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrákos (Dukes' A és B) minták kigyűjtése során a szemikvantitív CXCL1-GRO (p<0,0001) és MMP3 (p<0,0001) fehérje expresszió a lamina propriában mutatta a legerősebb szignifikáns eltérést az ADCS szekvencia során, 35 high-grade diszplasztikus és 25 korai vastagbélrákos minta mindkét markerrel történő elemzése esetében. Az antitest eredményét vonaldiagramon is szemléltetjük (**28. ábra**). Nyíllal jelöljük a rosszul besorolt mintákat. CXCL1 esetében a diszplasztikus adenoma minták 11,43%-a, (n=4) a korai vastagbélrák minták 11,11%-a (n=3) sorolódott be helytelenül, míg az MMP3 esetében nem tapasztaltunk eltérő kategorizálódást.



28. ábra: CXCL1 és MMP3 immunreakció alapján történő besorolás high-grade diszplasztikus adenoma (AD-HGD) és korai vastagbélrákos (CRC-A) minták esetén. Az Y-tengelyen a score értékek láthatóak (-2, 0, 1 és 2). Az X-tengelyen diszplasztikus adenoma és korai-vastagbélrák minták vannak feltűntetve. Mindkét festés esetében csak a lamina propriás eredményeket tekintjük át, CXCL1-GRO esetében kék, MMP3 esetében rózsaszín jelzés jelöli a score változást a két mintasorozatnál.





29. ábra: CXCL1 (A-E) és MMP3 (F-J) immunreakciók adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia során. Digitális mikroszkóp képek, 20x nagyítás, lépték: 100 μm.

A és F: egészséges vastagbél; B és G: low-grade diszplasztikus adenoma; C és H: high-grade diszplasztikus adenoma; D és I: korai vastagbélrák (CRC-A); E és J: késői vastagbélrák (CRC-C). Diszplázia-karcinóma átmenet során (C vs. D; H vs. I) mind az epithéliumban (fekete ponttal jelölve), mind a lamina propriában (fekete nyilakkal jelölve) az immunreakció erősebb reakciót mutatott korai vastagbélrákban.

5.8. A markersorozat elkülönítő képességének vizsgálata vérmintákon

Szöveti szinten a csoportok elkülönítésére alkalmas 11 transzkriptumból álló sorozatot vérmintákon is megvizsgáltuk diszkriminancia elemzés alkalmazásával. A vérmintákból készült microarray vizsgálatoknál összesen 47 minta szerepelt (16 egészséges, 12 adenomás és 19 CRC-s minta). A markerek együttes alkalmazása 58,3-73,7% közötti pontossággal sorolta be a vérmintákat a megfelelő diagnosztikai csoportba. Kereszt-validált módszer alkalmazásakor jelentős átsorolódást tapasztaltunk a mintacsoportok között, 33,3-73,7%-ra rontva a megfelelő csoportba történő besorolást. A legnagyobb problémát mindkét összehasonlításnál az adenomák felismerése/helyes besorolása jelenti, az adenoma minták ugyanis 40%-ot meghaladóan sorolódtak az egészséges, illetve a vastagbélrákos csoportba (12. táblázat). Logisztikus regressziót követően csak páros összehasonlításokat vizsgáltunk. A ROC elemzés 84,2%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást mutatott egészséges és CRC minták esetén. Egészséges és adenomás minták összehasonlítása során 78,9%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást határoztunk meg. A benignus adenoma és malignus vastagbélrákos colon minták összehasonlítása során 91,7%-os szenzitivitással és 75%os specifitással különítette el a mintákat a markerszet (30. ábra). A 13. táblázatban csak egészséges és vastagbélrákos microarray vérmintákon végeztük a diszkriminancia elemzést. Látható, hogy amennyiben kihagyjuk az adenoma mintákat az eredmények jelentősen javulnak. Ezt a javulást a keresztvalidált módszer nem mutatja olyan jelentősen, viszont összehasonlítva a 12. táblázat eredményeivel a különbség mégis jelentős. Eredeti számítás szerint 1 egészséges és 3 vastagbélrákos minta sorolódik át (93,8 és 84,2%-os elkülönítést biztosítva).

Fontos megjegyezni, hogy sok tanulmány esetében csak egészséges és vastagbélrákos mintákat szoktak összehasonlítani. Így fennáll annak a lehetősége, hogy a nem bemutatott betegcsoport (adenomás betegcsoport) jelentős mértékben hol az egyik, hol a másik csoporthoz sorolódna, ezáltal az alkalmazott marker/marker kombináció diagnosztikus értékéből jelentősen veszítene. Sajnos látható, hogy a markersorozat vérminták esetében csak akkor ad megfelelő elkülönítést, amennyiben csak egészséges és vastagbélrákos mintákat vizsgálunk. Feltételezésünk szerint a sorozat klinikumban való alkalmazása esetén fennállhat annak a lehetősége, hogy adenomás betegek valamelyik csoportba tévesen sorolódnak be.



30. ábra: ROC statisztika eredménye a vérmintás microarray mintasorozat elemein (47 minta) (**A-C**).

12. táblázat: 11 marker diszkriminancia elemzés eredményei egészséges normál, adenoma és CRC minták külön csoportosítása esetén.

		Független vérmintás mintasorozat (n=47) Microarray						
		Egészséges Adenoma CRC Össz						
Eredeti								
sz,ámítás	Mintaszám	Egészséges	12	3	1	16		
		Adenoma	3	7	2	12		
		CRC	2	3	14	19		
	%-os érték							
		Egészséges	75	18,8	6,3	100		
		Adenoma	25	58,3	16,7	100		
		CRC	10,5	15,8	73,7	100		
Kereszt-								
validált	Mintaszám	Egészséges	6	7	3	16		
		Adenoma	5	4	3	12		
		CRC	2	3	18	19		
	%-os érték							
		Egészséges	37,5	43,8	18,8	100		
		Adenoma	41,7	33,3	25	100		
		CRC	10,5	15,8	73,7	100		

		Függe Microarra	tlen vérmintás mintasor y. Egészséges és vastagl	rozat (n=35) oélrákos mintál	k.
			Egészséges	CRC	Összesen
Eredeti					
számítás	Mintaszám	Egészséges	15	1	16
		CRC	3	16	19
	%-os érték		-		
		Egészséges	93,8	6,3	100
		CRC	15,8	84,2	100
Kereszt-					
validált	Mintaszám	Egészséges	10	6	16
		CRC	4	15	19
	%-os érték				
		Egészséges	62,6	37,5	100
		CRC	21,1	78,9	100

13. táblázat: 11 marker diszkriminancia elemzés eredményei egészséges normál és vastagbélrákos minták esetében.

Amennyiben az adenoma minták téves besorolása a vastagbélrákos mintacsoport felé történne, akkor a sorozat alkalmazhatósága megmaradna, azonban vizsgálataink eredménye azt mutatja, hogy az adenomák 41,7%-ban az egészséges csoporthoz, 25%-ban a CRC-s csoporthoz (**12. táblázat** keresztvalidált összehasonlítás) sorolódnak.

Annak érdekében, hogy az adenomás betegek egészséges, illetve vastagbélrákos minták felé történő sorolódását meghatározzuk, az adenomás és CRC-s mintákat együttesen kezeltük, így ebben az összehasonlításban az egészséges, illetve beteg mintákat tudtuk elkülöníteni egymástól (**14. táblázat**). Összevetve az egészséges és CRC minták eredményével (**13. táblázat**) gyengébb értékeket kaptunk. Az egészséges elkülönítés az eredeti diszkriminancia számítás esetén 93,8% helyett 81,3%-ra, a beteg elkülönítés 84,2% helyett 80,6%-ra módosult. Az egészséges elkülönítés keresztvalidált számításnál 62,6% helyett 56,2%-ra, a beteg elkülönítés 78,9% helyett 64,5%-ra módosult.

14.	táblázat:	11	marker	diszkriminancia	elemzés	eredményei	egészséges	és
össz	evont bete	g (ac	denoma é	s CRC minták köz	zösen) mii	nták összehas	onlítása sorá	ín.

		Független vérmintás mintasorozat (n=47)				
		Microarray. Egészséges és 'beteg' minták.				
			Egészséges	Beteg	Összesen	
Eredeti számítás	Mintaszám	Egészséges	13	3	16	
		Beteg	6	25	31	
	%-os érték					
		Egészséges	81,3	18,8	100	
		Beteg	19,4	80,6	100	
Kereszt-validált	Mintaszám	Egészséges	9	7	16	
		Beteg	11	20	19	
	%-os érték					
		Egészséges	56,3	43,8	100	
		Beteg	35,5	64,5	100	

6. MEGBESZÉLÉS

Génexpressziós vizsgálatok segítségével számos, az adenoma-diszpláziakarcinóma szekvenciát jellemző jelátviteli expressziós útvonal azonosítása vált lehetővé. A nagy áteresztő képességű microarray technika vastagbélrák esetében is alkalmas arra, hogy az éppen aktuális tumoros milieu génexpressziós mintázatát jellemezzük, ezáltal jelentős technika a vastagbélrák kialakulásának és a betegség prognózisának vizsgálatában, valamint a terápiás válaszpredikció vonatkozásában is.

Az elmúlt évek során számos betegségspecifikus diagnosztikus és screening biomarkert/biomarker sorozatot írtak le, azonban ezek klinikai validációja során átütő eredményt nem sikerült elérni. Az aktuálisan alkalmazott vér és széklet alapú tumormarkerek (Burch et al. 2007; Soreide et al. 2009; Newton et al. 2012) szenzitivitása ingadozó, sok esetben nagyon alacsony (18-85%) vizsgálatok típusától függően), ám specificitásuk az esetek többségében megfelelő (85-90%). A vérben vizsgálható markerek gyulladásos állapotokban is megjelennek, aminek következtében érzékenységük és fajlagosságuk tovább romolhat.

A vastagbélrák kialakulásáért felelős markerek közül számos marker jelöltet klinikai vizsgálat során tesztelnek napjainkban. Ilyenek a székletben vizsgált APC, K-ras, L-DNS és p-53 DNS markerek. Nagy előnyük, hogy a székletben előforduló emésztett vér tartalomhoz képest a DNS-t hordozó sejtek leválása a hámrétegről folyamatosnak tekinthető, ezáltal a székletben lévő sejtek mutációi (K-ras, p53, APC), mikroszatellita instabilitása (MSI), vagy a hosszú DNS fragmentáltsága (L-DNA) vizsgálható (Tanaka et al. 2010).

A vérből kimutatható TIMP-1 fehérje olyan többfunkciós glikoprotein, amely mátrix metalloproteinázokat gátol. Vastagbéltumoros betegek esetében plazmában magasabb szintet mutat, mint más betegcsoportokban (mellrák, colon adenoma, IBD) (Holten-Andersen et al. 1999, 2004a; Sorensen et al. 2008). Két független tanulmány is megerősítette, hogy az előrehaladott vastagbélrákos eseteket magas TIMP-1 szint jellemzi (Holten-Andersen et al. 1999, 2004b). A vérplazma DNS marker SEPT9 szenzitivitása a korábban említett egyedi markerekhez hasonlóan alacsonyabb a kívántnál (55-60%), melyet több független vizsgálat is megerősített (Lofton-Day et al. 2008 és Church et al. 2014). A marker szenzitivitiása a CRC progressziójával párhuzamosan növekszik (stage I: 35%, II: 63%, III: 46%, IV: 77,4%), a specificitás

stabilan a 90%-os érték felett marad. A rákmegelőző állapotnak minősülő "late-stage" adenoma elkülönítésére azonban 11,2%-os szenzitivitás alapján alkalmatlannak bizonyult (Church et al. 2014).

Számos ígéretes vér alapú tumormarker jelöltet nem csak önállóan, hanem panelben (DcR3, MIC1, Reg IV, Spondin-2 és Trail-R2) is vizsgálnak, melyek esetén önállóan a magas specificitás (~90%) mellett alacsony szenzitivitás (40-60%) mérhető. Kivételt képez a prolaktin (Soroush et al. 2004), a CCSA 2-4 (Brunagel et al. 2002) és a laminin (Saito et al. 2005), melyek szenzitivitása 80-90%. A panelben történő alkalmazásuk során mind a szenzitivitás, mind a specificitás 90% fölé emelhető.

A fentiek alapján elmondható, hogy nagy igény van olyan vastagbélrák specifikus biomarkerekre, melyek nemcsak szöveti, de vér szinten is alkalmasak arra, hogy a betegséget megfelelő érzékenységgel és fajlagossággal jelezzék. Másrészt a beteg együttműködése is jobb egy vérvételt tekintve – mely kevésbé invazív vizsgálat – a kolonoszkópiához képest. Fontos figyelembe venni azt is, hogy mind a szöveti, mind a vér alapú vastagbélrák biomarker vizsgálatok során az esetek többségében nem végezték el az egészséges és kolorektális karcinóma csoportok mellett a rákmegelőző állapotnak tekinthető adenomákkal történő együttes összehasonlítást, így a közölt szenzitivitás/specificitás értékek a legtöbb esetben csak egészséges és vastagbélrákos vizsgálatokra korlátozódnak. Ezek alapján viszont felmerül a kérdés, hogy a benignus tumorok kategorizálása/besorolása a szenzitivitás és specificitás értékeit miként befolyásolhatja.

Vizsgálatainkban törekedtünk arra, hogy minél több környezetben (biopszia és vérminták) és technika megközelítéssel (génexpressziós microarray, RT-PCR, immunhisztokémiai fehérje expresszió) vizsgáljuk meg a meghatározásra került marker jelölt sorozatot. Vizsgálataink során olyan transzkriptum sorozatot határoztunk meg, amely alkalmas az ADCS átmenet jellemzése mellett, a sporadikus vastagbélrák kialakulásában döntő fontosságú diszplázia-karcinóma átmenet (tranzíció) jellemzésére is, melynek átmenete során erős elkülönítő hatást tapasztaltunk. Az általunk meghatározott 11 marker jelöltet tartalmazó csoport egyaránt kifejezett elkülönítő hatást mutatott egészséges/vastagbélrákos, egészséges/adenomás és adenomás/vastagbélrákos minták páros összehasonlítása esetében és alkalmas volt az egyes betegségcsoportok azonosítására és egymástól történő elkülönítésére is. Vizsgálatunk egyike az első

tanulmányoknak, melyben olyan teljes genom oligonukleotid microarray elemzést végeznek, melyben az egészséges és vastagbélrákos minták mellett adenomás bioptátumokat is használ. Vizsgálatunk során nemcsak teljes genom génexpressziós vizsgálatot, de fehérjeszintű validációt és komplex bioinformatikai elemzést is végeztünk.

Az első körben 53 vastagbél biopsziás mintán génexpressziós vizsgálatot végeztünk, amely mintasorozat esetében meghatározott betegség-specifikus génszet elkülönítő képességét további 94 tagú mintasorozaton – független biopsziás mintán – genomszintű génexpressziós array vizsgálatunkban validáltunk.

Az "tréning" mintasorozat mintáinak esetében a diszkriminancia elemzés a minták 96,2%-át – keresztvalidáció esetén 83%-át – a csoportbeosztásnak megfelelően sorolta be. A "teszt" mintasorozat mintáinak esetében a diszkriminancia elemzés a minták 93,6%-át – keresztvalidáció esetén 91,5%-át – a csoportbeosztásnak megfelelően sorolta be. Az átsorolódások az adenomás és vastagbélrákos minták esetében történtek egymás csoportjai, illetve az egészséges mintacsoport felé. A páros ROC összehasonlítások eredményei (szenzitivitás és specificitás) még ennél is magasabb százalékos értékeket mutattak.

A "tréning" és "teszt" mintasorozat elemzésének szétválasztása azért kiemelendő, mivel eltérések voltak a minta előkészítés folyamatában (cRNS szintéziséhez és fragmentálásához eltérő kit-ek alkalmazása), és ez befolyásolhatja a kapott eredményeket, ezáltal túlbecsülve a különböző stádiumok közötti megkülönböztethetőség hatásfokát. Azonban mindkét mintasorozat esetében nagyfokú eltérést sikerült detektálnunk, külön figyelmet érdemel az egészséges minták kiváló elkülönülése benignus és malignus tumormintáktól.

Az így kapott eredményeket *in silico* validációnak is alávetettük, a Gene Expression Omnibus adatbázis alkalmazásával további független, teljes genom szintű microarray adatokon is leteszteltük az eredetileg meghatározott betegség-specifikus transzkriptum csoportunkat. A vizsgálatba vont két *in silico* vizsgálat eredménye a transzkriptumok jelentős részében megerősítette saját microarray kísérlet eredményeinket. Főkomponens-elemzés szerint az egészséges vs. benignus adenoma (GSE8671), valamint egészséges vs. malignus tumor csoportok elkülönülése bizonyosságot nyert (GSE18105). További *in silico* vizsgálatunkban – mivel saját

vizsgálataink során nem nyílt lehetőségünk mikroszatellita instabilitás és metilációs fenotípus vizsgálatára – a GSE39582 azonosító számú vizsgálat kiválasztott 19 egészséges mucosa, valamint 24 CIMP- és 13 CIMP+ és 14 MSI és 22 MSS vastagbélrák mintájának összehasonlítását is elvégeztük. Szignifikáns eltérést a vastagbéltumorok esetében, tekintettel metilációs fenotípusukra, illetve mikroszatellita instabilitásukra nem találtunk, azonban az egészséges mucosa vs. CRC minták összehasonlítása során minden transzkriptum esetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk.

Génexpressziós microarray vizsgálatainkat valós idejű RT-PCR módszerrel is igazoltuk. Az eljárás során azonosított 11 transzkriptumból álló markersorozat alkalmazhatónak bizonyult egészséges, adenomás és CRC-s biopsziás minták elkülönítésére. A diszkriminancia elemzés a minták 95,6%-át – a keresztvalidáció esetén 91,5%-át – a csoportbeosztásnak megfelelően sorolta be. Ezen felül a sorozat alkalmasnak bizonyult arra is, hogy elkülönítsük a high-grade diszplasztikus adenomákat és a korai vastagbélrákos mintákat magas specificitás és szenzitivitás értékek mellett. A RT-PCR eredmények szenzitivitása és specificitása magasabb volt, mint a kiindulásként szereplő összevont microarray mintasorozat esetén mért 83,3%-os specificitás és 100%-os szenzitivitás. A validáció során 90,9%-os specificitást és 100%os szenzitivitás mértünk, amely 100%-os elkülönítésre módosult a minták utánkövetése után, mivel kiderült, hogy korábban két high-grade diszplasztikusnak vélt minta valójában *in situ* karcinómaként lett megállapítva a második patológiai szakvélemény szerint. A konvencionális PCR módszerrel betegségspecifikus minta elkülönítést hajthatunk végre alacsony költségvonzatú módszer alkalmazásával. A kvantitatív RT-PCR vizsgálatok alkalmassága, a diagnosztikai vizsgálatok költséghatékony és rutinszerű alkalmazása megerősítést nyert. Automatizálásuk is egyszerűbb, így a mintafeldolgozás a teljes RNS izolálástól a tényleges génexpressziós elemzésig automatizálható, egyszerűsíthető.

A meghatározott markersorozat alkalmazhatóságát nemcsak vastagbél biopsziás, de perifériás vérminták alkalmazásával is kipróbáltuk. Páronkénti összehasonlítás során ugyan magas elkülönítő képességet sikerült elérnünk, azonban diszkriminancia elemzésünk eredményei alapján azt tapasztaltuk, hogy számos egészséges minta átsorolódik az adenoma mintacsoportba, ami az eredeti, lokális (vastagbél biopsziás)

génexpressziós markersorozat elkülönítő képességét perifériás vérminták esetében jelentősen csökkentette. Az esetek döntő többségében (a minták 40%-át meghaladóan) a jóindulatú tumorok besorolódása sem volt megfelelő. Az egészséges minták 75%-a, az adenoma és a vastagbélrákos minták 58,3% és 73,7%-a sorolódott megfelelően az diszkriminancia elemzés eredeti számítása alapján. Páros ROC elemzések során legjobb értékeket az egészséges vs. vastagbélrákos minták esetében kaptuk, 84%-os szenzitivitás mellett 100%-os specificitást. Ezek az értékek meghaladják számos klinikai alkalmazásban, illetve preklinikai vizsgálati stádiumban lévő marker 18-85% között variáló szenzitivitását, és 85-90% közötti specificitását (Newton et al. 2012). Amennyiben az egészséges mintákat jó és rosszindulatú daganatok ellenében vizsgáltuk, az egészséges minták 81,3%-a, a benignus és malignus tumorok 80,6%-a sorolódott megfelelően az eredeti elemzés alapján. Megjegyzendő, mint ahogy korábban írtuk a legtöbb molekuláris biológia markerszet vizsgálata során csak egészséges és vastagbélrákos mintákat hasonlítottak össze más munkacsoportok, így ezen vizsgálatok esetében fennáll annak a lehetősége, hogy a leírt magas szenzitivitású és specificitású elkülönítő hatás a valóságban alacsonyabb fajlagossági és érzékenységi mutatókkal rendelkezik.

A 11 marker közül – egy kivételtől eltekintve (COL12A1) – mindegyik (IL8, MMP3, IL1B, CHI3L1, GREM1, IL1RN, CXCL1, CXCL2, CA7 és SLC7A5) ismerten részt vesz a kolorektális karcinogenezis folyamatában és a tumoros propagatióban. Hat marker (IL8, CHI3L1, CXCL1, CXCL2, MMP3 és SLC7A5) esetében már korábbi microarray tanulmányokban is eltérő expressziót találtak egészséges vs. vastagbélrákos minták esetében (Shih et al. 2005, Birkenkamp-Demtroder et al. 2005, Chen et al. 2011, Hannelien et al. 2011, Yan et al. 2012). Biopsziás mintákon végzett microarray génexpressziós eredményeink 9 transzkriptum esetében lépcsőzetes emelkedést mutatnak az ADCS során. A GREM1 esetében az adenoma és egészséges génexpressziót figyeltünk meg a CA7 esetében, ahol a benignus és malignus minták jellemzően alulexpresszáltak voltak az egészséges mintákhoz viszonyítva. A "tréning" sorozat eredményei esetében megállapíthatjuk, hogy – valószínűleg a fentebb említett hibridizációs eltéréseknek köszönhetően – az egészséges és adenomás minták minden

esetben közelebbi expressziót mutattak egymáshoz, mint az adott transzkriptum validációjaként elvégezett "teszt" microarray és független RT-PCR mintasorozatokon elvégzett vizsgálatok. További LCM microarray génexpressziós vizsgálatok alapján az IL1RN és IL1B esetében, eltérő expressziós változásokat tapasztaltunk mind hám, mind stróma régióban. Lépcsőzetes ADCS expressziós változást tapasztaltunk IL8, CXCL1, CXCL2, CHI3L1, és COL12A1 markerek esetében hám régióban. Döntő többségükben stromális emelkedett génexpresszió volt megfigyelhető vastagbélrák mintacsoport esetében. A fennmaradó 4 marker esetében, a CA7, mely egyedüliként az egészséges mintákban mutatott nagyobb aktivitást, a hámban szintén ilyen irányultságú eltérést mutatott. Az SLC7A5 és GREM1 esetében mind strómában, mind hámban emelkedett aktivitást mutattak a CRC-s minták, az MMP3 esetében – egyedüli markerként – csak strómában tapasztaltunk emelkedett irányú pozitivitást.

A génexpressziós microarray és valós idejű RT-PCR vizsgálataink esetén tapasztalható eltéréseket a mintacsoportok között részben fehérje expressziós mintázatok vizsgálata is igazolta, hiszen összesen 7 antitest esetében sikeresen vizsgáltunk független minták fehérje expresszióját is. Lépcsőzetes változás figyelhető meg a hám régióban IL8, CXLC1-2 és SLC7A5, COL12A1 markerek esetében. MMP3 esetében inkább a stromális régióban figyelhető meg a CRC irányába fokozódó változás. CA7 esetében a génexpressziós elemzések esetében megfigyelt csökkenő expresszió figyelhető meg tumoros irányba.

Génexpressziós és immunhisztokémiai vizsgálataink során biopsziás mintákon a vizsgált markerek változásait, külön-külön is megvizsgáltuk, melyet a gének rövid bemutatásával együttesen tárgyalunk. A **karbon anhidráz-7 (CA7)** egy cinket tartalmazó metalloenzim, ami a szén-dioxid szénsavvá történő hidratációját katalizálja. Emlősökben összesen 13 aktív CA-izoenzimet ismerünk. Némelyik CA-izoenzimről (CA2, CA9 és CA12) már leírták, hogy részt vesznek a tumor kialakulás folyamatában (Haapasalo et al. 2007), sőt a CA-család tagjait elsőként vastagbélrákban azonosították. CRC esetében a CA2 kifejeződése csökkent, a CA9-é nőtt (Kivela et al. 2001). A CA9 és a CA12 vonatkozásában azt is megfigyelték, hogy invazív mellrák esetében utóbbi kifejezetten alkalmas prognosztikai és előjelző marker (Watson et al. 2003). A CA7 esetében mi állapítottuk meg elsőként a vastagbélrákkal való kapcsolatát, előttünk még semmilyen rákos megbetegedésben sem azonosították. Vizsgálataink során ennél a

markernél tapasztaltuk csak azt, hogy egészséges mintákon emelkedett expressziót mutat. Ennek feltételezhető oka az, hogy a gén metilálódik, tehát expressziója alacsonyabb értékű a vastagbélrákos mintákban (Pastorekova et al. 2006). LCM microarray vizsgálataink során is emelkedett expressziót tapasztaltunk hámban és strómában is az egészséges mintáknál. Immunhisztokémiai vizsgálataink is megerősítették a felszíni hámban az emelkedett expresszió intenzitást (jellemző empirikus score érték: +2) egészséges mintákban. Ez az intenzitás a kripta bázisa felé folyamatos csökkent. Benignus és malignus tumorok esetében közepesen erős, illetve gyenge intenzitású (jellemző empirikus score érték: +1 és 0) immunreakciókat figyeltünk meg.

Az interleukin-1 (IL-1) és az interleukin 1 receptor antagonista (IL1RN) jól ismert proinflammatorikus citokinek, pleiotróp biológiai hatással rendelkeznek. A családba 3 fehérje tartozik: az IL1A, az IL1B és inhibítoruk, az IL1RN. Az IL1B-t többek között a monocyta/makrofág rendszer sejtjei termelik, és mind az akut, mind a krónikus gyulladásos folyamatokban részt vesz, de a tumoros mikrokörnyezet stimulálásában is szerepe van, elősegítve a proliferációt és az angiogenezist. Magas IL1B mRNS expresszió figyelhető meg kissejtes tüdőrákban (Landvik et al. 2009). Ismert az is, hogy az IL1B polimorfizmus összefüggést mutat Dukes' B stádiumú vastagbélrákkal (Lurje et al. 2009), azonban pontos funkciója a tumoros propagatióban még nem teljesen ismert. Ismert, hogy az IL1B a karcinogenezis egyik közvetítője (Apte et al. 2008), számos rákos megbetegedés esetében változik az expressziója (tüdőrák, leukémia, bőrrák, mellrák és vastagbélrák) (Xu et al. 2013). Biopsziás mintákon végzett génexpressziós elemzéseink esetében az ADCS során folyamatos emelkedést figyeltünk meg. LCM microarray összehasonlításaink során mind egészséges, mind CRC-s minták esetében expresszió emelkedést határoztunk meg, mind a hám, mind a stróma régióban. Az IL1RN ezt részben megerősítették az immunhisztokémiai vizsgálataink, melynek során az egészséges morfológiájú metszeteken a hámsejtekben erős citoplazma festődés mellett, viszont mind az adenomás, mind a CRC-s hámban csökkent festődést figyeltünk meg.

A következő 3 gén a kemokin géncsaládhoz tartozik. A fehérjék, melyeket kódolnak olyan kisméretű (8-14kD), főleg bázikus, szerkezetileg kapcsolt molekulák, melyek szabályozzák egyes leukocyták mozgását, kemotaktikus hatásúak. Kritikus

szerepet játszanak az immunválaszban, az immunsejtek gyulladás területhez történő toborzásában (recruitment). A család tagjai két alcsaládra oszthatóak: a CXC és a CC csoportokra. Az elkülönítés alapja a 4 konzervált cisztein első két tagjának elhelyezkedése. Amennyiben a 2 cisztein között egy aminosav található, akkor CXC kemokinről, amennyiben közöttük nem található aminosav, akkor pedig CC kemokinről beszélünk. Az interleukin-8 (IL8) a CXC kemokin család tagja. A gyulladásos válasz egyik fő közvetítője, két G fehérje receptorhoz (CXCR1 és CXCR2) kapcsolódik. Sejtproliferációt és migrációt okoz, többek között metalloproteináz bontással (Verbeke et al. 2011). Fokozott expressziója számos rákban, endothel sejtben, tumor-asszociált makrofágban arra utal, hogy az IL-8 jelentős regulációs faktora a tumoros mikrokörnyezetnek. Expresszióját stimulálják a proinflammatorikus citokinek (TNF, IL-1B), kémiai és környezeti stressz faktorok (hypoxia és kemoterápiás szerek hatása), ill. szteroid hormonok (androgének és ösztogének). A tumorsejtek proliferációját és túlélését autokrin jelátviteli úton is elősegítheti. Számos tumoros betegségben vizsgálták, mint prediktív faktort, többek között hererákban (Koçak et al. 2004), prosztatarákban (Duan et al. 2005) és vastagbélrákban (Cacev et al. 2008, Doll et al. 2010). Expresszióját azonban számos gyulladásos állapot befolyásolhatja. Ebből kifolyólag önállóan nem, de más potenciális biomakerekkel együttesen alkalmazva ígéretes tumorspecifikus marker lehet (Shahzad et al. 2010). Biopsziás mintákon végzett génexpressziós elemzéseink esetében az ADCS során folyamatos expresszió emelkedést figyeltünk meg. LCM microarray összehasonlításaink során a vastagbélrákos minták megemelkedett expressziót figyeltünk meg, mind hám, mind stróma esetében. A génexpressziós eredményeket megerősítik további immunhisztokémiai vizsgálataink, melyek során az egészséges mintákban a hámsejtek gyenge diffúz citoplazmatikus festődésűek voltak. Adenoma hámban kismértékű immunpozitivitás növekedése volt megfigyelhető, míg vastagbélrákos minták esetében közepesen erős/erős magfestés, illetve az adenománál erősebb citoplazmatikus festődést detektáltunk.

A kemokin (C-X-C motívumos) ligandum 1 és 2 (CXCL1 és CXCL2) a CXC kemokin család tagjai 90%-ban megegyezik az aminosav sorrendjük, s ugyanazon a receptoron – CXCR2 – fejtik ki hatásukat. Alapvető szerepet játszanak az angiogenesis, gyulladás, sebgyógyulás, valamint a tumorkialakulás folymatában. Különböző tumorok növekedése és terjedése során eltérő expresszió jellemzi őket. Fokozott működést

mutatnak vastagbélrákban (Verbeke et al. 2011, Hannelien et al. 2011), bőrrákban (Dhawan et al. 2002) és mellrákban (Vazquez-Martin et al. 2007; Lerebours et al. 2008). A CXCL2 vastagbélrákban felülexpresszált, s feltételezhető, hogy fontos szerepet játszik a diszplázia-karcinóma átmenetben (Eberhart et al. 1994, Doll et al. 2010, Sarvaiya et al. 2013). Biopsziás mintákon végzett génexpressziós elemzéseink megerősítették a publikációkban közölt fokozott génexpressziót vastagbélrákban. LCM microarray vizsgálataink során a vastagbélrákos minták esetében figyeltünk meg expresszió emelkedést, mind hám, mind stróma régióban. Immunhisztokémiai összehasonlítások során a fehérje hámbeli expressziója egészséges mintákban enyhe, diffúz citoplazmatikus volt (jellemző score érték: +1). Génexpressziós vizsgálatainkat megerősítette, hogy az adenomákban és karcinomákban a hám fehérje expressziója erősebbnek bizonyult és sejtmagpozitivitás is megjelent. Az adenoma és vastagbélrák minták között eltérést figyeltünk meg (+1 és +2 score értékek egyaránt jellemzőek voltak).

A gremlin-1 (GREM1) a TGFB jelátviteli útvonal egyik inhibitora, valamint a csont morfogenetikus fehérjék (BMP) antagonistája. Microarray kísérleti eredmények is bizonyítják, hogy a GREM1 – számos más BMP antagonistával együtt – szerepet játszik számos rákos sejt túlélésében és proliferációjában, valamint a fejlődés korai szakaszában és a tumorképződésben is részt vesz. Szöveti microarray vizsgálatok alapján hasnyálmirigy, vastagbél, tüdő, mell és hererák esetében is (Sneddon et al. 2005) fokozott fehérje expressziót mutatott. Biopsziás mintákon végzett génexpressziós elemzéseink alapján az egészséges és adenoma mintacsoportok között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk. Vizsgálataink is megerősítették a vastagbélrákos minták emelkedett expresszió változást mindhárom génexpressziós vizsgálat esetében. LCM microarray vizsgálataink során megerősítettük a vastagbélrákos minták emelkedett expresszió változását, mind hám, mind stróma régióban. Immunhisztokémiai vizsgálatokat nem végeztünk ennél a marker jelöltnél.

XII típusú α1 kollagén (COL12A1) olyan fontos folyamatokban vesz részt, mint a csontrendszer fejlődése, vagy a sejtadhézió. Vastagbélrákban fokozott expressziót figyeltek meg (Karagiannis et al. 2012). Ezt megerősítették génexpressziós vizsgálataink is, a vastagbélrákos minták irányába fokozódó expressziót figyeltünk meg. A trend hasonló volt LCM microarray esetében is, bár stróma esetén az egészséges és

adenomás mintacsoportok között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Immunhisztokémiai vizsgálataink során a hámexpresszió elenyésző volt mindhárom mintacsoport esetében, azonban az adenoma-karcinóma szekvencia során a strómában fokozódó expressziót figyeltünk meg.

A kitináz-3-szerű fehérje 1 (CHI3L1) a kitinázok családjába tartozik, melyek a kitin hidrolizációjában játszanak szerepet. Egy olyan helper T sejt aktiváló citokin, ami mind a tumoros mikrokörnyezetben, mind a tumoros betegek vérszérumában emelkedett szintet mutat (Høgdall et al. 2009). Expressziós szintje szorosan korrelál a tumoros megbetegedés stádiumával és a várható átlagos túléléssel is, ezáltal biomarkernek kifejezetten alkalmas (Johansen et al. 2003). Vastagbélrák mellett (Chen et al. 2011) többek között petefészekrákban (Høgdall et al. 2009), mellrákban (Yamac et al. 2008) és prosztatarákban (Kucur et al. 2008) figyelték meg expresszió emelkedését. Génexpressziós vizsgálatainkban az ADCS során folyamatosan növekvő expresszió változás figyeltünk meg, melyet az LCM microarray vizsgálatok is megerősítettek, különösen hám esetében. Immunhisztokémiai vizsgálatokat nem végeztünk ennél a marker jelöltnél.

A folyadék transzporter család 7, 5. tagja (SLC7A5) pozitív töltésű aminosav szállító molekula, ami fontos szerepet játszik a sejtproliferáció és az angiogenesis folyamatában, de az *in vivo* tumornövekedésben is szerepe van. Biomarkerként való alkalmazása már mell- (Shennan et la. 2008), tüdő- (Imai et al. 2009) és prosztatarák (Sakata et al. 2009) esetében is bizonyítottan eredményes. Génexpressziós vizsgálataink során az ADCS során növekvő génexpressziót figyeltünk meg. LCM microarray vizsgálatok során a vastagbélrákos minták esetén tapasztaltunk megemelkedett génexpressziót. Immunhisztokémia esetén a hámszövetekben, az egészséges mintákban gyenge/közepes (jellemző score érték: 0 és +1) erősségű diffúz citoplazma festődést találtunk, mely az adenoma mintacsoportnál erősebbé vált (jellemző score érték: +1). Vastagbélrákban a festődés intenzitása hasonló volt az adenoma mintacsoport tagjaihoz, azonban néhány esetben kifejezetten erős plazma festődést láttunk (jellemző score érték: +2).

A mátrix metalloproteináz-3 (MMP3) a mátrix metalloproteináz családba tartozik, az extracelluláris mátrix lebontásában vesz részt olyan normális fiziológiai folyamatok során, mint az embrionális fejlődés, reprodukció, de szerepe van olyan

kórfolyamatokban is, mint egyes ízületi gyulladásos állapotok, vagy a rákos sejtek növekedése, apoptózisa, ill. az angiogenesis. Az MMP-3 expresszió változását néhány tumor esetében – melanoma (Tas et al. 2008), vastagbélrák (Jeffery et al. 2009) és gyomorrák (Yeh et al. 2012) – leírták már. Génexpressziós vizsgálataink során fokozatosan emelkedő expressziót figyeltünk meg az ADCS során. LCM microarray eredmények hám régióban moderált emelkedést mutattak mind benignus, mind malignus tumorokban, stróma régióban pedig csak a vastagbélrákos mintacsoportban erősítették meg megfigyelésünket. Immunhisztokémiai vizsgálataink során az egészséges strómában kismértékű, gyakrabban közepes expressziója volt megfigyelhető. Adenomában a strómasejtek MMP3 termelésének emelkedését figyeltük meg (közepesen erős/erős expresszió), míg vastagbélrák esetében az MMP3 expresszió legtöbbszőr erős volt. Egészséges strómában néhány sejt gyenge pozitivitást mutatott, míg adenomában és karcinómban a strómális sejtek nagy százaléka közepesen erős/erős festődést mutatott.

További immunhisztokémiai vizsgálataink arra irányultak, hogy minél kevesebb antitest bevonásával a legjobban elkülöníthessük az ismeretett mintacsoportokat, különös tekintettel a klinikailag is fontos high-grade diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrák mintákat. Új vizsgálataink során két antitest bizonyult a legjobbnak, a CXCL1-GRO mely mind hámban, mind lamina propriában, az MMP3, pedig lamina propriában mutatott markáns eltérést. Mindkét vizsgált fehérje expressziós mintázat a lamina propriában mutatott pozitív korrelációt az ADCS során. Az alkalmazott Fisheregzakt teszt eredménye alapján szignifikáns eltérést (p<0,0001) tapasztaltunk diszplasztikus adenoma és korai vastagbélrákos minták esetében a mintacsoportok között. A két marker együttes alkalmazása diszkriminancia elemzés során, 88-89% körüli megbízható csoportba való sorolódást mutatott, mind a diszplasztikus adenoma, mind korai vastagbélrákos minták esetében.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeinket összefoglalását követően megállapíthatjuk, hogy az egészséges, adenoma és vastagbéltumoros szöveti mintákból izolált totál RNS alkalmasnak bizonyult teljes genomszintű microarray vizsgálathoz, melynek alkalmazásával több 10.000 gén egyidejű vizsgálatára nyílik lehetőség. Vizsgálatunkban ismételt microarray vizsgálatokat alkalmazásakor olyan 11 tagú markercsoportot határoztunk meg, amellyel lehetőségünk nyílt elkülöníteni a vizsgálati mintacsoportokat. Az említett markerek együttes alkalmazásával az adenoma-diszplázia-karcinóma szekvencia változások egyes stádiumainak meghatározására – mellyel a betegség progressziót tudjuk meghatározni – lehetőségünk nyílik. Eredményeinket in silico adatok bevonásával is megerősítettük, a markersorozat együttes változásai más kutatócsoportok által elvégzett vizsgálatokban is nagyfokú elkülönítést tesznek lehetővé. Az azonosított transzkriptumsorozat alkalmasnak bizonyult a high-grade diszplasztikus adenoma és a korai vastagbélrákos minták elkülönítésére, mely elkülönítéssel lehetőség nyílik a tumoros progresszió pontos mértékének meghatározására. Klinikai alkalmazásban a pontos benignus, malignus meghatározás kiemelten fontos feladat. További vizsgálatok során (RT-PCR és immunhisztokémia) sikerült a markerek eltérését megerősíteni, olyan technikák alkalmazásával melyek költségigénye lényegesen alacsonyabb, sikeresebben és hatékonyabban alkalmazhatóak a későbbiekben esetleges klinikai vizsgálatokban. A szöveti markersorozat vérmintákon is nagyfokú elkülönítést mutatott egészséges és beteg minták összehasonlításakor. Vizsgálataink rámuttatnak arra, hogy a sok esetben kérdéses, nehezen osztályozható szövettan ellenében a génexpressziós technikák bevonásával pontosabb diagnosztikai kiértékelést érhetünk el. Költséghatékony technikai megközelítéssel a mindennapi rutinban is használható vizsgálati megközelítéseket vezethetünk be. Végső soron a minél kevésbé invazív vizsgálati módszerek térnyerése lenne előnyös, mind a vizsgálatokon való részvételi arány növelése, mind a vizsgálatok érzékenységének növelése érdekében.
8. ÖSSZEFOGLALÁS

Génexpressziós vizsgálataink során olyan mRNS biomarker sorozatot azonosítottunk, amelynek segítségével az egészséges szövet, adenoma és karcinoma állapotok között megbízható, magas érzékenységű és fajlagosságú elkülönítést sikerült elérnünk. Ezen biomarkerek az adenoma-karcinóma átmenetben progresszív eltéréseket mutatnak, melynek változásait mind a 11 marker esetében vizsgáltunk microarray (biopsziás, illetve lézer-mikrodisszekált minták esetében), RT-PCR, valamint immunhisztokémiai vizsgálatok során. Mindhárom technikai megközelítéssel sikerült az egyes biomarkerek változó kifejeződését igazolnunk.

Az azonosított biomarker sorozat elkülönítő hatását *in silico* módszerrel, a GEO adatbázis felhasználásával egészséges és adenoma (GSE8671), valamint egészséges és vastagbéltumoros, független biopszia mintákon is igazoltuk (GSE18105). A malignus vastagbéltumorok esetében a transzkriptum sorozat tagjainak mikroszatellita instabilitását, illetve metilációs fenotípus specificitását *in silico* vizsgálatban tisztáztuk. A GSE39582 azonosító számú génexpressziós microarray vizsgálatban, CIMP- és CIMP+, valamint MSI és MSS beosztás esetében a transzkriptumok nem mutattak szignifikáns eltérést, az egészséges minták ellenében viszont igen. Ezen utóbbi eltérések megerősítik saját microarray és RT-PCR vizsgálataink, valamint az *in silico* vizsgálatok eredményét.

Beteg nyomonkövetést követően a sorozat alkalmazása során sikeresen detektáltuk két high-grade diszplasztikus adenomás mintáról, hogy azok valójában korai vastagbélrákos minták. A biomarker sorozat alkalmazhatósága ebben az esetben érzékenyebb volt, mint a patológiai véleményezés. Az átsorolódás után mind microarray, mind RT-PCR-es validáció magasabb specificitást eredményezett.

Fehérjeszintű vizsgálatokkal fehérjeszinten is igazoltuk, hogy a biomarkerek közül az MMP3 és a CXCL-GRO együttes alkalmazása erős elkülönítést biztosított high-grade diszplasztikus adenoma és a korai-vastagbélrák között.

Az alkalmazott biomarker sorozat elkülönítő ereje szérum markerként is jó elkülönítést biztosított abban az esetben – sok nemzetközi összehasonlításhoz hasonlóan – amennyiben egészséges és vastagbélrákos mintákat hasonlítottunk össze. A sorozat ereje csökkent amennyiben az adenomák megfelelő csoportba való sorolódását is vizsgáltuk.

9. SUMMARY

During gene expression examination we have searched mRNA biomarker set that could provide reliable, high sensitivity and specificity separation for healthy normal, adenoma and CRC samples. These markers show progressive differences within adenomacarcinoma transition sequence. Each of the 11 markers was examined according to these changes in case of micrarray (biopsy and laser capture microdissected samples), RT-PCR and immunhistochemistry. All three technical approach were prosperous in justify the changing of expression among sample groups.

Differential effects of the identified biomarker series were confirmed with *in silico* method, using the GEO database. Independent healthy normal and adenoma (GSE8671), and healthy normal and CRC (GSE18105) samples were examined to confirm our findings. Further *in silico* examination (GSE39582) confirmed that there were no significant differences among CIMP- and CIMP+, MSI and MSS comparisons of tumors in the aspects of 11 transcripts. Comparing these samples to healthy mucosa showed significant alteration in all cases.

After patient follow-up after two high-grade dysplastic adenomas were successfully detected as early colon cancer samples. Applicability of biomarker set was more sensitive than the pathology opinion. After correct regrouping both microarray and RT-PCR validation resulted higher specificity.

Immunhistochemical studies have also confirmed that the use of combined biomarkers of MMP-3 and the CXCL1-GRO provided a strong separation between high-grade dysplastic adenomas and early-colon cancer.

The applied biomarker set provided good separation as serum marker if healthy and normal colon cancer samples were compared, similarly to other international comparisons. The power of the set decreased if adenomas were involved in the examination.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ (2002). Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. J Natl Cancer Inst, 94:513–21.

2. Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H (2005). Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: A biomarker study. BMC Cancer 5, 8.

3. Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ (1999). Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci USA, 96:6745–50.

4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2015.

5. American Cancer Society. Detailed Guide: Colon and Rectum Cancer. 2014. Accessed at www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/DetailedGuide/index.

6. Apte RN, Voronov E (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? Immunol Rev 222: 222–241

7. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholad C, Lesser M, Mariadason JM, Augenlicht LH (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. Br J Cancer 2004;91:1931–46.

8. Arango D, Laiho P, Kokko A, Alhopuro P, Sammalkorpi H, Salovaara R, Nicorici D, Hautaniemi S, Alazzouzi H, Mecklin JP, Jarvinen H, Hemminki A, Astola J, Schwartz S Jr, Aaltonen LA (2005). Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. Gastroenterology, 129:874–84.

9. Barrier A, Boelle PY, Lemoine A, Tse C, Brault D, Chiappini F, Lacaine F, Houry S, Huquier M, Flahault A, Dudoit S (2005). Gene expression profiling of nonneoplastic mucosa may predict clinical outcome of colon cancer patients. Dis Colon Rectum, 48:2238–48.

10. Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, Breittschneider J, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Van der Laan MJ, Speed T, Debuire B, Flahault A, Dudoit S. (2005). Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. Oncogene, 24:6155–64.

11. Barrier A, Boelle PY, Roser F, Gregg J, Tse C, Brault D, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Franc B, Flahault A, Lemoine A, Dudoit S. (2006). Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. J Clin Oncol, 24:4685–91.

12. Barrier A, Roser F, Boëlle PY, Franc B, Tse C, Brault D, Lacaine F, Houry S, Callard P, Penna C, Debuire B, Flahault A, Dudoit S, Lemoine A. (2007). Prognosis of stage II colon cancer by nonneoplastic mucosa gene expression profiling. Oncogene, 26:2642–8.

13. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res, 72:141-96.

14. Benjamini Y, Hochberg, Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multipletesting. Journal of the Royal Statistical Society Series B. 85, 289–300 (1995)

15. Benjamini Y and Y Hochberg (2000). On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing with Independent Statistics. Journal of Educational and Behavioral Statistics, 2000.

16. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. (2004). Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histological parameters. Oncogene, 23:1377–91.

17. Bevan S, Woodford-Richens K, Rozen P, et al (1999). Screening SMAD1, SMAD2, SMAD3, and SMAD5 for germline mutations in juvenile polyposis syndrome. Gut 1999;**45**:406–8.

18. Bianchini M, Levy E, Zucchini C, Pinski V, Macagno C, De Sanctis P, Valvassori L, Carinci P, Mordoh J. (2006). Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. Int J Oncol, 29:83–94.

19. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sřrensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF (2005). Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. Gut, 54:374–84.

20. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998). A

National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res, 15;58(22):5248-57.

21. Brunagel G, Vietmeier BN, Bauer AJ, Schoen RE, Getzenberg RH (2002). Identification of nuclear matrix protein alterations associated with human colon cancer. Cancer Res.62, 2437–2442.

22. Burch JA, Soares-Weiser K, St John DJ, Duffy S, Smith S, Kleijnen J, Westwood M. (2007). Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. J Med Screen 14:132–7

23. Cacev T, Radosević S, Krizanac S, Kapitanović S (2008). Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. Carcinogenesis, Aug;29(8):1572-80. doi: 10.1093/carcin/bgn164. Epub 2008 Jul 14.

24. Cavalieri D, Dolara P, Mini E, et al. (2007). Analysis of gene expression profiles reveals novel correlations with the clinical course of colorectal cancer. Oncol Res, 16:535–48.

25. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. Nature, 3;395(6697):89-93.

26. Chen CC, Pekow J, Llado V, Kanneganti M, Lau CW, Mizoguchi A, Mino-Kenudson M,Bissonnette M, Mizoguchi E (2011). Chitinase 3-like-1 expression in colonic epithelial cells as a potentially novel marker for colitis-associated neoplasia. Am J Pathol, 179(3):1494-503. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.038.

27. 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 DV (2014). Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. Gut 2014;63: 317–325.

28. Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM, Guenther K, Siebenhaar R, Stremmel C, Matzel KE, Papadopoulos T, Kirchner T, Behrens J, Klein-Hitpass L, Stuerzl M, Hohenberger W, Reingruber B. (2005). Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. Int J Colorectal Dis, 20:353–62.

29. Croner **RS**, Förtsch T, Brückl WM, Rödel F, Rödel C, Papadopoulos T, Brabletz T, Kirchner T, Sachs M, Behrens J, Klein-Hitpass L, Stürzl M, Hohenberger W, Lausen B.

(2008). Molecular signature for lymphatic metastasis in colorectal carcinomas. Ann Surg, 247:803–10.

30. de la Chapelle A (2003). Microsatellite instability. N Engl J Med, 17;349(3):209-10.

31. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevi C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, Bareil C, Kramar A, Salvetat N, Fraslon C, Conseiller E, Granci V, Leblanc B, Pau B, Martineau P, Ychou M. (2007). Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. J Clin Oncol, 25:773–80.

32. Dezső P, Nagy J (2005). A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. Magyar Kémiai Folyóirat; 111(4):153-7.

33. Dhawan P, Richmond A (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. J Leukoc Biol, 72:9-18.

34. diaDexus Inc. (2007) Clinical application of diaDexus diagnostics in colorectal cancer http://www.diadexus.com/ products/research/oncoogy_diagnostics.php

35. Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, Janssen KP (2010). Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. Int J Colorectal Dis. 2010 May;25(5):573-81. doi: 10.1007/s00384-010-0901-1. Epub.

36. Duan ZG, Yang WM (2005). Analysis of cytokines (IL-2, IL-8, IL-10) in the expressed prostatic secretions of chronic prostatitis. Zhonghua Nan Ke Xue, 11(3):201-3.

37. Duffy MJ (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful? Clin. Chem. 47, 624–630.

38. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O (2007). Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. Eur. J. Cancer 43, 1348–1360.

39. D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A, Digito M, Esposito G, Bertola A, Fabris M, Nofrate V, Mammano E, Leon A, Nitti D, Lise M (2005). Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. Int J Cancer, 115:256–62.

40. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology, 107(4):1183-8.

41. Eden S, Cedar H (1994). Role of DNA methylation in the regulation of transcription. Curr Opin Genet Dev, 4(2):255-9.

42. Eide TJ (1986). Risk of colorectal cancer in adenoma-bearing individuals within a defined population. Int J Cancer 38: 173–6.

43. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhøffer M, Aaltonen L, Orntoft TF, Quackenbush J, Yeatman TJ (2005). Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. J Clin Oncol, 23:3526–35.

44. Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 1;61(5):759-67.

45. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2012). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

46. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. European Journal of Cancer, 49(6): 1374-1403

47. Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Řrntoft TF (2003). Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. J Cancer Res Clin Oncol, 129:263–71.

48. Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, Janssen KP, Maeckl C, Nekarda H, Holzmann B, Siewert JR (2005). Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression. Int J Colorectal Dis, 20:391–402.

49. Galamb O, Györffy B, Sipos F, Spisák S, Németh AM, Miheller P, Tulassay Z, Dinya E, Molnár B (2008). Inflammation, adenoma and cancer: objective classification of colon biopsy specimens with gene expression signature. Dis Markers, 25:1–16.

50. 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.

51. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tó th K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B (2010). Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. Br J Cancer, 102:765–773.

52. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montaqna C, Füzesi L, Langer CBecker H, Liersch T, Ried T (2005). Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. J Clin Oncol, 23:1826–38.

53. Grade M, Hörmann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, Simon R, Liersch T, Becker H, Difilippantonio MJ, Ghadimi BM, Ried T (2007). Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph nodepositive colon carcinomas. Cancer Res, 67:41–56.

54. Grady WM (2004). Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev.23, 11–2710.1023/A:1025861527711

55. Groene J, Mansmann U, Meister R, Staub E, Roepcke S, Heinze M, Klaman I, Brümmendorf T, Hermann K, Loddenkemper C, Pilarsky C, Mann B, Adams HP, Buhr HJ, Rosenthal A (2006). Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. Int J Cancer, 119:1829–36.

56. Haapasalo J, Nordfors K, Järvelä S, Bragge H, Rantala I, Parkkila AK, Haapasalo H, Parkkila S (2007). Carbonic anhydrase II in the endothelium of glial tumors: a potential target for therapy. Neuro Oncol, 9:308 – 13.

57. Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, Prieto DA, Finlay WJ, Podust VN, Roman JM, Oevermann E, Schiedeck T, Homann N, Duchrow M, Conrads TP, Veenstra TD, Burt SK, Bruch HP, Auer G, Ried T (2006). Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. Gastroenterology 131, 1020-1029; quiz 1284.

58. Han, M., Liew, C. T., Zhang, H. W., Chao, S., Zheng, R., Yip, K. T., Song, Z. Y., Li, H. M., Geng, X. P., Zhu, L. X., Lin, J. J., Marshall, K. W. and Liew, C. C. (2008)

Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 14, 455-460

59. Hannelien Verbeke, Sofie Struyf, Geneviève Laureys, Jo Van Damme (2011). The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer, Cytokine & Growth Factor Reviews, Volume 22, Issues 5–6, October–December, Pages 345-358

60. 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, 15;8(10):1174-83.

61. Høgdall EV, Ringsholt M, Høgdall CK, Christensen IJ, Johansen JS, Kjaer SK, Blaakaer J, Ostenfeld-Møller L, Price PA, Christensen LH (2009). YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. BMC Cancer, 9: 8.

62. Holten-Andersen MN, Murphy G, Nielsen HJ, Pedersen AN, Christensen IJ, Hoyer-Hansen G, Brunner N, Stephens RW (1999). Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer. Br. J. Cancer, 80, 495–503.

63. Holten-Andersen MN, Fenger C, Nielsen HJ, Rasmussen AS, Christensen IJ, Brunner N, Kronborg O (2004). Plasma TIMP-1 in patients with colorectal adenomas: A prospective study. Eur. J. Cancer 2004, 40, 2159–2164.

64. Hundt S, Haug U, Brenner H (2007). Blood markers for early detection of colorectal cancer: A systematic review. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16, 1935–1953.

65. Hurst NG, Stocken DD, Wilson S, Keh C, Wakelam MJ, Ismail T (2007). Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. Br. J. Cancer, 97, 971–977.

66. Imai H, Kaira K, Oriuchi N, Yanagitani N, Sunaga N, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M (2009). L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer. Histopathology, 54 (7): 804–13.

67. Issa JP, Shen L, Toyota M (2005). CIMP, at last. Gastroenterology, 129(3):1121-4.
68. Issa JP (2008). Colon cancer: it's CIN or CIMP. Clinical Cancer Research, vol. 14, no. 19, pp. 5939–5940, 2008

69. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA (1999). Characterisation of a subtype of

colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. J Clin Pathol, 52(6):455-60.

70. Jass JR (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology, 50(1):113-30.

71. Jeffery N, McLean MH, El-Omar EM, Murray GI (2009). The matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase profile in colorectal polyp cancers. Histopathology, Jun;54(7):820-8. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03301.x.

72. Johansen JS, Christensen IJ, Riisbro R, Greenall M, Han C, Price PA, Smith K, Brünner N, Harris AL (2003). High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. Breast Cancer Res. Treat, 80 (1): 15–21.

73. Jones PA, Laird PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet, 21(2):163-7.

74. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA (2004). BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. Gut, 53(8):1137-44.

75. Karagiannis GS, Petraki C, Prassas I, et al. Proteomic signatures of the desmoplastic invasion front reveal collagen type XII as a marker of myofibroblastic differentiation during colorectal cancer metastasis (2012). Oncotarget. 2012;3:267–285.

76. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol, 25:3230–7.

77. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, Chang HJ, Ahn SA, Park HW, Jang SG, Park JH, Kim DY, Jung KH, Choi HS, Jeong SY, Sohn DK, Kim DW, Park JG (2007). Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. Dis Colon Rectum, 50:1342–53.

78. Kim K, Park U, Wang J, Lee J, Park S, Kim S, Choi D, Kim C, Park J (2008). Gene profiling of colonic serrated adenomas by using oligonucleotide microarray. Int J Colorectal Dis, 23:569–80.

79. Kita H, Hikichi Y, Hikami K, Tsuneyama K, Cui ZG, Osawa H, Ohnishi H, Mutoh H, Hoshino H, Bowlus CL, Yamamoto H, Sugano K (2006). Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis. J Gastroenterol, 41:1053–63.

80. Kivela AJ, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila TS, Rajaniemi H (2001). Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membraneassociated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors. Dig Dis Sci, 46:2179 – 86.

81. Kleivi K, Lind GE, Diep CB, Meling GI, Brandal LT, Nesland JM, Myklebost O, Rognum TO, Giercksky KE, Skotheim RI, Lothe RA (2007). Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses. Mol Cancer, 6(2).

82. Koçak H, Oner-Iyidoğan Y, Koçak T, Oner P (2004). Determination of diagnostic and prognostic values of urinary interleukin-8, tumor necrosis factor-, and leukocyte arylsulfatase-A activity in patients with bladder cancer. Clinical Biochemistry, 37:673-678.

83. Koehler A, Bataille F, Schmid C, Ruemmele P, Waldeck A, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W (2004). Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage. J Pathol, 204:65–74.

84. Komuro K, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Matsunaga A, Teramoto K, Shindoh G, Takada M, Murakawa K, Kanai M, Kobayashi N, Fujiwara Y, Nishimura N, Hamada J, Ishizu A, Ikeda H, Kondo S, Katoh H, Moriuchi T, Yoshiki T (2005). Right- and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis. J Surg Res, 124:216–24.

85. Kucur M, Isman FK, Balci C, Onal B, Hacibekiroglu M, Ozkan F, Ozkan A (2008). Serum YKL-40 levels and chitotriosidase activity as potential biomarkers in primary prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Oncol*, **26**:47-52.

86. Kwon HC, Kim SH, Roh MS, Kim JS, Lee HS, Choi HJ, Jeong JS, Kim HJ, Hwang TH (2004). Gene expression profiling in lymph nodepositive and lymph node-negative colorectal cancer. Dis Colon Rectum, 47:141–52.

87. Kwong KY, Bloom GC, Yang I, Boulware D, Coppola D, Haseman J, Chen E, McGrath A, Makusky AJ, Taylor J, Steiner S, Zhou J, Yeatman TJ, Quackenbush J (2005). Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression. Genomics, 86:142–58.

88. Landvik NE, Hart K, Skaug V, Stangeland LB, Haugen A, Zienolddiny S (2009). A specific interleukin-1B haplotype correlates with high levels of IL1B mRNA in the lung and increased risk of non-small cell lung cancer. Carcinogenesis 30, 1186–1192.

89. Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. Jul 2;358(6381):15-6.

90. Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, Kim H (2008). Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. Am. J. Clin. Pathol, 129, 772–779.

91. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology 2010; 138:2088–100.

92. Leman ES, Schoen RE, Magheli A, Sokoll LJ, Chan DW, Getzenberg RH (2008). Evaluation of colon cancer-specific antigen 2 as a potential serum marker for colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 14, 1349–1354.

93. Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, Espie M, Marty M, Lidereau R, Bieche I (2008). NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer. BMC Cancer, 8:41.

94. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. Br J Surg, 89:845-60.

95. Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M, Ishikawa O, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, Furukawa Y (2004). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. Int J Oncol, 24:305–12.

96. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y (2002). Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. Oncogene, 21:4120–8.

97. Lin HM, Chatterjee A, Lin YH, Anjomshoaa A, Fukuzawa R, McCall JL, Reeve AE (2007). Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis. Oncol Rep; 17:1541–9.

98. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grutzmann R, Pilarsky C, Sledziewski A (2008). DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clin. Chem, 54, 414–423.

99. Loktionov A, O'Neill IK, Silvester KR, Cummings JH, Middleton SJ, Miller R (1998). Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 4, 337–342.

100. Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D, Manegold PC, Ning Y, Zhang W, Lenz HJ (2009). Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. Pharmacogenet Genomics 19: 95–102.

101. Lynch HT, de la Chapelle A (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. J Med Genet, 36(11):801-18.

102. Lynch HT, de la Chapelle A (2003). Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med, 6;348(10):919-32.

103. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Lesser M, Schwartz EL, Augenlicht LH (2003). Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. Cancer Res, 63:8791–812.

104. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value (2013). PLoS Med 2013;10(5):e1001453

105. Markowitz SD, Roberts AB (1996). Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. Cytokine Growth Factor Rev, 7(1):93-102.

106. Matsuyama T, Ishikawa T, Mogushi K, Yoshida T, Iida S, Uetake H, Mizushima H, Tanaka H, Sugihara K (2010). MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer. Int J Cancer, 127:2292–2299.

107. Maurel J, Nadal C, Garcia-Albeniz X, Gallego R, Carcereny E, Almendro V, Marmol M, Gallardo E, Maria Auge J, Longaron R, Martinez-Fernandez A, Molina R, Castells A, Gascon P (2007). Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. Int. J. Cancer, 121, 1066–1071.

108. May P, May E (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene, 18(53):7621-36.

109. McLachlan GJ (2004). Discriminant analysis and statistical pattern recognition. In: Wiley Series in Probability and Statistics. New York: Wiley-Interscience. 1–50.

110. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Thieme H, Kaufmann R, Mothes H, Settmacher U, Claussen U, Halbhuber KJ, Von Eggeling F (2005). Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. Gastroenterology 129, 66–73.

111. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med, 1(7):686-92.

112. Mills AA (2001). P53: link to the past, bridge to the future. Genes Dev 2005; 19: 2091–2099.

113. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997). Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nat Genet, 17(3):271-2.

114. Mroczko B, Groblewska M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Okulczyk B, Kedra B, Laszewicz W, Dabrowski A, Szmitkowski M (2007). Serum macrophagecolony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis. Clin. Chim. Acta, 380, 208–212.

115. Nagy F (2003). Diseases of the colon. In: Lonovics J, Tulassay Z, Varró V, editors. Clinical Gastroenterology. Budapest: Medicina, p.197-266.

116. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G (2009). Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. Cancer Treat Rev 35:201–209.

117. Neugut AI, Jacobson JS, Ahsan H, Santos J, Garbowski GC, Forde KA, Treat MR, Waye J (1995). Incidence and recurrence rates of colorectal adenomas: a prospective study. Gastroenterology 108: 402–8.

118. Newton KF, Newman W, Hill J (2012). Review of biomarkers in colorectal cancer. Colorectal Disease, 14(1):3-17.

119. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ (2001). Trascriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. Cancer Res, 61:3124–30.

120. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst, 6;96(19):1420-5.

121. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. (2006). Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. Adv Clin Chem, 42: 167 – 216.

122. Petrik J (2001). Microarray technology: the future of blood testing? Vox Sang. Jan; 80(1):1-11.

123. R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

124. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science, 14;275(5302):967-9.

125. 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(3):198-202.

126. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, Theisen J, Mages J, Becker K, Nekarda H, Rosenberg R, Janssen KP, Siewert JR (2008). Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. Clin Gastroenterol Hepatol, 6:53–61.

127. Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann M.L, Berndt P, Engel A.M, Schneidinger B, Pfeffer M, Andres H, Karl J, Bodenmuller H, Ruschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rosch W, Langen H, Zolg W, Tacke M (2005). Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. Clin. Cancer Res, 11, 6550–6557.

128. Roessler M, Rollinger W, Mantovani-Endl L, Hagmann M.L, Palme S, Berndt P, Engel A.M, Pfeffer M, Karl J, Bodenmuller H, Ruschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rosch W, Langen H, Zolg W, Tacke M (2006). Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. Mol. Cell Proteomics, 5, 2092–2101.

129. Rozen P, Macrae F (2006). Familial adenomatous polyposis: The practical applications of clinical and molecular screening. Fam Cancer. 5(3):227-35.

130. Sabates-Bellver J, Van der Flier LG, de Palo M, Cattaneo E, Maake C, Rehrauer H, Laczko E, Kurowski MA, Bujnicki JM, Menigatti M, Luz J, Ranalli TV, Gomes V, Pastorelli A, Faggiani R, Anti M, Jiricny J, Clevers H, Marra G (2007). Transcriptome profile of human colorectal adenomas. Mol Cancer Res, 5:1263–1275.

131. Saito N, Kameoka S (2005). Serum laminin is an independent prognostic factor in colorectal cancer. Int. J. Colorectal. Dis. *20*, 238–244.

132. Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, Ueno A, Kanai Y, Endou H, Okayasu I (2009). L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. Pathol. Int, 59 (1): 7–18.

133. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. Oncotarget 4, 2171–2185.

134. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H (1998). Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. Cancer 82: 60–9.

135. Schneider J, Bitterlich N, Schulze G (2005). Improved sensitivity in the diagnosis of gastro-intestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles including the tumor M2-PK. Anticancer Res, 25, 1507–1515.

136. Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G (2010). Interleukin 8 (IL-8) - an universal biomarker? International Archives of Medicine, 3:11

137. Shennan DB, Thomson J (2008). Inhibition of system L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. Oncol. Rep, 20 (4): 885–9.

138. Shih W, Chetty R, Tsao MS (2005). Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). Oncol Rep, 13(3):517-24.

139. Shimizu D, Ishikawa T, Ichikawa Y, Togo S, Hayasizaki Y, Okazaki Y, Danenberg PV, Shimada H (2005). Prediction of chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil by gene expression profiling with cDNA microarrays. Int J Oncol, 27:371–6.

140. Sipos F, Germann TM, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B, Műzes G (2014). MMP3 and CXCL1 are potent stromal protein markers of dysplasia–carcinoma transition in sporadic colorectal cancer. European Journal of Cancer.

141. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed y cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. PNAS, 103(40):14842-14847.

142. Soreide K, Nedrebo BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Soreide JA, Korner H (2009). Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: Potential implications for the surgical oncologist. *Surg. Oncol. 18*, 31–50.

143. Sorensen NM, Schrohl AS, Jensen V, Christensen IJ, Nielsen HJ, Brunner N (2008). Comparative studies of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in plasma, serum and tumour tissue extracts from patients with primary colorectal cancer. Scand. J. Gastroenterol, 43, 186–191.

144. Soroush AR, Zadeh HM, Moemeni M, Shakiba B, Elmi S (2004). Plasma prolactin in patients with colorectal cancer. BMC Cancer, 4, 97.

145. Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. Nov 5;98(3):503-17.

146. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ (1996). Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. Nat Genet, 14(3):255-7.

147. Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW (1996). A detailed analysis of Kras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. Int J Cancer, 21;69(3):241-5.

148. Szentirmay Z, Csuka O (2004). A vastagbélrák molekuláris patológiája, A vastagbélrák megelőzése és kezelése, szerkesztő: Tulassay Z, Springer Tudományos Kiadó.

149. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al (2001). Analysis of K-ras, APC, and betacatenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. Gastroenterology, 121 (2001), pp. 599–611

150. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T, Ishigamori R (2010). Biomarkers for colorectal cancer. Int J Mol Sci, 13;11(9):3209-25. doi: 10.3390/ijms11093209.

151. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E (2008). Circulating levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and BCL-2 in malignant melanoma. Med Oncol, 25, 431-6.

152. Tibshirani RJ, Hastie TJ, Narasimhan B, Chu G (2002). Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 6567–6572

153. Toll AD, Fabius D, Hyslop T, Pequignot E, DiMarino AJ, Infantolino A, Palazzo JP (2011). Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas. Colorectal Dis 13:370–3.

154. Toyota M, Issa JP (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. Semin Cancer Biol, 9(5):349-57.

155. Tumor Analysis Best Practices Working Group (2004). Expression profiling-best practices for data generation and interpretation in clinical trials. Nat Rev Genet, 5:229-237.

156. Tusher V, Tibshirani R, and Chu G (2001). Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98:5116–5121, 2001.

157. Vazquez-Martin A, Colomer R, Menendez JA (2007). Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer. Eur J Cancer, 43:1117-1124.

158. Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J (2011). The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 22, 345–358.10.1016/j.cytogfr.2011.09.002

159. 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, 319:525-32.

160. Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D (2004). Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B Colon Cancer. J Clin Oncol, 22:1564–71.

161. Watson PH, Chia SK, Wykoff CC, Han C, Leek RD, Sly WS, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL (2003). Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. Br J Cancer, 7;88(7):1065-70.

162. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet. 2006;38:787–793.

163. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C (2003). Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. Clin Cancer Res, 9:931–46.

164. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'brien MJ, Levin B, Smith RA, Lieberman DA, Burt RW, Levin TR, Bond JH, Brooks D, Byers T, Hyman N, Kirk L, Thorson A, Simmang C, Johnson D, Rex DK (2006). Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society task force on colorectal cancer and the American Cancer Society. CA Cancer J Clin 56: 143–59.

165. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C; Gastrointestinal Consortium Panel (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale updated based on new evidence. Gastroenterology 124:544–560.

166. Wortley S, Wong G, Kieu A, Howard K (2014). Assessing stated preferences for colorectal cancer screening: a critical systematic review of discrete choice experiments. Patient. 2014;7(3):271-82. doi: 10.1007/s40271-014-0054-3.

167. Wu CC, Chen HC, Chen SJ, Liu HP, Hsieh YY, Yu CJ, Tang R, Hsieh LL, Yu JS, Chang YS (2008). Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. Proteomics, 8, 316–332.

168. Wu Z and Irizarry RA (2005) A Statistical Framework for the Analysis of Microarray Probe-Level Data

169. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, Liu P, Shu Y (2013). Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. PLoS ONE 8(5): e63654. doi:10.1371/journal.pone.0063654

170. Yamac D, Ozturk B, Coskun U, Tekin E, Sancak B, Yildiz R, Atalay C (2008). Serum YKL-40 levels as a prognostic factor in patients with locally advanced breast cancer. *Adv Ther*, **25**:801-9.

171. Yamasaki M, Takemasa I, Komori T, Watanabe S, Sekimoto M, Doki Y, Matsubara K, Monden M (2007). The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer. Int J Oncol, 30:129–38.

172. Yan Z, Li J, Xiong Y, Xu W, Zheng G (2012). Identification of candidate colon cancer biomarkers by applying a random forest approach on microarray data. Oncol Rep, 28(3):1036-42. doi: 10.3892/or.2012.1891

173. Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, Kitahara O, Kameyama M, Murata K, Ishikawa O, Nakamura Y (2001). Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. Neoplasia, 5:395–401.

174. Yashiro M, Hirakawa K, Boland CR (2010). Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stage of colorectal cancer with microsatellite instability. BMC Cancer, 10 (2010), pp. 303–307

175. Yeh YC, Sheu BS, Cheng HC, Wang YL, Yang HB, Wu JJ (2010). Elevated serum matrix metalloproteinase-3 and -7 in H.pylori-related gastric cancer can be biomarkers correlating with a poor survival. Dig Dis Sci, 55, 1649-57.

176. Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P (2004). Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. World J. Gastroenterol. 10, 1643–1646.

177. Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ (2002). Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. Oncogene, 21:4855–62.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájában, nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Galamb O, <u>Wichmann B</u>, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. Dysplasia-Carcinoma Transition Specific Transcripts in Colonic Biopsy Samples. *PLOS ONE* 7:(11) p. e48547. (2012)
 IF:3,73

2. Sipos F, Germann TM, <u>Wichmann B</u>, Galamb O, Spisák S, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B, Műzes G. MMP3 and CXCL1 are potent stromal protein markers of dysplasia-carcinoma transition in sporadic colorectal cancer. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION* 23:(5) pp. 336-343. (2014)
IF: 2,764

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

3. Spisák S, Galamb B, Sipos F, Galamb O, <u>Wichmann B</u>, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Tulassay ZS, Molnár B. Applicability of antibody and mRNA expression microarrays for identifying diagnostic and progression markers of early and late stage colorectal cancer. *DISEASE MARKERS* 28:(1) pp. 1-14. (2010) **IF:1,723**

4. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, <u>Wichmann B</u>, Krenács T, Valcz G, Tulassay ZS, Molnár B. Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 102:(4) pp. 765-773. (2010) IF: 4,831

5. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Feher J, Ghyczy D, <u>Wichmann B</u>, Selmeci L, Tulassay Z, Racz K, Somogyi A. Serum Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Insulin

Resistant Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Novel Liver Disease Biomarker. *PLOS ONE* 5:(8) p. e12226. (2010) IF: 4,411

6. Sipos F, Galamb O, <u>Wichmann B</u>, Krenacs T, Toth K, Leiszter K, Muzes G, Zagoni T, Tulassay Z, Molnar B. Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *DISEASE MARKERS* 30:(1) pp. 1-17. (2011) IF: 1,642

7. Toth K, Galamb O, Spisak S, <u>Wichmann B</u>, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnar B, Tulassay Z. The Influence of Methylated Septin 9 Gene on RNA and Protein Level in Colorectal Cancer. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 17:(3) pp. 503-509. (2011)

IF: 1,366

8. Valcz G, Krenacs T, Sipos F, Patai AV, <u>Wichmann B</u>, Leiszter K, Toth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymasi K, Masszi T, Molnar B, Tulassay Z. Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY* 64:(9) pp. 771-775. (2011) **IF: 2,306**

9. Varga T, Somogyi A, Barna G, <u>Wichmann B</u>, Nagy G, Racz K, Selmeci L, Firneisz G. Higher Serum DPP-4 Enzyme Activity and Decreased Lymphocyte CD26 Expression in Type 1 Diabetes. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 17:(4) pp. 925-930. (2011)

IF: 1,366

10. Valcz G, Sipos F, Krenacs T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Toth K, <u>Wichmann B</u>, Molnar B, Tulassay Z. Increase of alpha-SMA(+) and CK (+) Cells as an Early Sign of Epithelial-Mesenchymal Transition during Colorectal Carcinogenesis. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 18:(2) pp. 371-376. (2012)

IF: 1,555

11. Toth K, Sipos F, Kalmar A, Patai AV, <u>Wichmann B</u>, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnar B. Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers. *PLOS ONE* **7:**(9) *p. e46000.* (2012)

IF: 3,73

12. Spisák S, Kalmár A, Galamb O, <u>Wichmann B</u>, Sipos F, Péterfia B, Csabai I, Kovalszky I, Semsey S, Tulassay Z, Molnár B. Genome-Wide Screening of Genes Regulated by DNA Methylation in Colon Cancer Development. *PLOS ONE* 7:(10) Paper e46215. 11 p. (2012)

IF: 3,73

13. Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, <u>Wichmann B</u>, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z. The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. *BMC CANCER* 13: Paper 50. 13 p. (2013)

IF: 3,319

14. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, <u>Wichmann B</u>, Kalmár A, Patai AV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. Sporadic Colorectal Cancer Development Shows Rejuvenescence Regarding Epithelial Proliferation and Apoptosis. *PLOS ONE* 8:(10) Paper e74140. 10 p. (2013)

IF: 3,534

15. Fűri I, Sipos F, Spisák S, Kiszner G, <u>Wichmann B</u>, Schöller A, Tulassay Z, Műzes G, Molnár B. Association of self-DNA mediated TLR9-related gene-, DNA methyltransferase and cytokeratin protein expression alterations in HT29-cells to DNA fragment length and methylation status. *THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL* 2013:(2013) Paper 293296. 8 p. (2013)

IF: 1,219

132

16. Kiszner G, <u>Wichmann B</u>, Nemeth IB, Varga E, Meggyeshazi N, Teleki I, Balla P, Maros ME, Penksza K, Krenacs T. Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY* 464:(5) pp. 603-612. (2014)

IF: 2,56

17. Valcz G, Patai AV, Kalmár A, Péterfia B, Fűri I, <u>Wichmann B</u>, Műzes G, Sipos F, Krenács T, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z. Myofibroblast-Derived SFRP1 as Potential Inhibitor of Colorectal Carcinoma Field Effect. *PLOS ONE* 9:(11) Paper e106143. 8 p. (2014)

IF: 3,534

18. Toth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmar A, <u>Wichmann B</u>, Leiszter K, Valcz G, Juhasz M, Miheller P, Patai AV, Tulassay Z, Molnar B. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLOS ONE* 9:(12) Paper e115415. 19 p. (2014) **IF: 3,534**

Műzes G, Sipos F, Fűri I, Constantinovits M, Spisák S, <u>Wichmann B</u>, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Preconditioning with intravenous colitic cell-free DNA prevents DSS-colitis by altering TLR9-associated gene expression profile. *DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES* 59:(12) pp. 2935-2946. (2014)
 IF: 2,55

20. Sipos F, Műzes G, Fűri I, Spisák S, <u>Wichmann B</u>, Germann TM, Constantinovits M, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Intravenous administration of a single-dose freecirculating DNA of colitic origin improves severe murine DSS-colitis. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 20:(4) pp. 867-877. (2014) **IF: 1,806** 21. Kalmar A, Peterfia B, <u>Wichmann B</u>, Patai AV, Bartak BK, Nagy ZB, Furi I, Tulassay Z, Molnar B. Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods for DNA Methylation Analysis of Biopsy, Fresh Frozen, and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Colorectal Cancer Samples. *JOURNAL OF LABORATORY AUTOMATION* In press: p. In press. 10 p. (2015) **IF:1,5**

22. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenacs T, Veres G, <u>Wichmann B</u>, Furi I, Kalmar A, Patai AV, Toth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnar B. Promoter Hypermethylation-Related Reduced Somatostatin Production Promotes Uncontrolled Cell Proliferation in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 10:(2) p. e0118332. (2015)

IF: 3,534

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik segítették PhD munkám elkészítését: Programvezetőmnek, **Prof. Dr. Tulassay Zsolt** és kutatócsoport vezetőmnek **Prof. Dr. Rácz Károly** egyetemi tanárnak,

 - és témavezetőmnek, Dr. Molnár Béla tudományos tanácsadónak, hogy lehetővé tették és támogatták PhD munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;

- Dr. Müllner Katalin és Dr. Igaz Péter házi opponenseknek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért;
- Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának, Dr. Sipos Ferencnek és Kalmár Alexandrának szakmai segítségéért, tanácsaiért;

- Dr. Valcz Gábornak és Dr. Krenács Tibornak a szakmai és a szöveti microarray vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért;

- Kónyáné Farkas Gabriella szakasszisztensnek a gyakorlati munkámban nyújtott segítségükért;
- a Sejtanalitika Laboratórium összes dolgozójának támogatásukért;
- köszönettel tartozom Családomnak kitartó szeretetükért és támogatásukért.

13. MELLÉKLETEK I.

Év Szerző Platform Minták Tanulmány tervezet Eredmények Validáció 40 adenokarcinóma Karcinóma vs. egészséges 2000 elkülönítő gént Alon 1999 Affymetrix _ azonosítottak mucosa 22 egészséges colon 10 adenokarcinóma Karcinóma vs. adenoma vs. 4000 elkülönítő gént 4 adenoma 2001 Affymetrix **RT-PCR** Notterman egészséges mucosa azonosítottak 22 egészséges colon 10 primer tumor 47 elkülönítő gént 2001 **RT-PCR** Yanagawa **cDNS** Primer tumor vs. metasztázis azonosítottak 10 hozzátartozó metasztatikus lézió 8 adenokarcinóma Karcinóma vs. egészséges 235 elkülönítő gént cDNS **RT-PCR** Kitahara 2001 8 egészséges mucosa azonosítottak mucosa 9 adenoma 50 elkülönítő gént 11 adenokarcinóma **RT-PCR** Lin 2002 **cDNS** Adenoma vs. karcinóma azonosítottak 20 hozzátartozó egészséges mucosa 9 adenokarcinóma Karcinóma vs. egészséges 250 elkülönítő gént Zou 2002 cDNS **RT-PCR** azonosítottak mucosa 8 egészséges mucosa 60 különböző stádiumú primer 339 tumor progresszióval Northern Karcinóma vs. máj áttét vs. adenokarcinóma 2002 Agrawal Affymetrix egészséges mucosa összefüggő gén blot 10 egészséges mucosa

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció
XV:11:	2002		20 adenokarcinóma	Karcinóma vs. egészséges	2632 elkülönítő gént	
williams	2003	CDNS	CDNS20 hozzátartozó egészséges mucosamucosaazonosítottak		azonosítottak	KI-PCK
			20 különböző stádiumú primer adenokarcinóma		Az alkalmazott génszelekciós módszer	
Frederiksen	2003	Affymetrix	5 egészséges mucosa	Molekuláris osztályozás	alapján 74, ill. 124 elkülönítő gént azonosítottak	-
Vuuan	2004	DNS	12 adenokarcinóma	Karcinóma vs. egészséges	112 elkülönítő gént	RT-PCR
KWOII	2004	CDNS	12 hozzátartozó egészséges mucosa	mucosa	azonosítottak	
Koehler)4 cDNS	25 különböző stádiumú primer adenokarcinóma	Primer tumor vs. egészséges mucosa	40 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR
	2004		25 hozzátartozó egészséges mucosa	Primer tumor vs. metasztázis	Nem találtak génexpressziós különbséget	
			14 máj metasztázis			
I i	2004		14 primer mCRC	Primer tumor vs.	429 elkülönítő gént	DT DCD
LI	2004	CDNS	11 primer non mCRC	metasztázis	azonosítottak	RT-PCR
Portucci	2004	2004 cDNS	22 adenokarcinóma karcinóma v muc	Karcinóma vs. egészséges mucosa	245 elkülönítő gént azonosítottak	ШС
Bertucci	2004		23 egészséges mucosa	Jobb és bal oldali primer tumor	46 elkülönítő gént azonosítottak	ше
			30 adenokarcinóma	30 adenokarcinómaKarcinóma vs. egészséges451 elkülönítő gént azonosítottakozzátartozó egészséges mucosamucosa451 elkülönítő gént azonosítottak	451 elkülönítő gént	5 korábbi
Croner	2005	Affymetrix	30 hozzátartozó egészséges mucosa m		azonosítottak	publikált tanulmány,

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció	
Komuro	2005	cDNS	89 primer tumor	Jobb és bal oldali primer tumor	191 elkülönítő gént azonosítottak	_	
Kwong		05 cDNS	28 különböző stádiumú primer adenokarcinóma	Karcinóma vs. egészséges mucosa	70 elkülönítő gént azonosítottak		
	2005		10 egészséges mucosa		151 elkülönítő gént	2D-PAGE tömegspektr	
			10 máj metasztázis	azonosítottak	ometria		
Friederichs		2005 Affymetrix	25 különböző stádiumú primer adenokarcinóma	Karcinóma vs. egészséges mucosa	1995 elkülönítő gént azonosítottak		
			ffymetrix 6 egészséges mucosa	Molekuláris osztályozás	1680 elkülönítő gént azonosítottak Dukes' B és normál mucosa között 9 elkülönítő gént	_	
	2005				azonosítottak Dukes' B és C stádium között 50 elkülönítő gént		
					azonosítottak Dukes' C és D stádium között		
					19 elkülönítő gént azonosítottak Dukes' C és D stádium között		

Szerző	Év	Platform	Minták	Minták Tanulmány tervezet F		Validáció
Birkenkamp-				Jobb és baloldali egészséges mucosa	160 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR
	2005	Affymetrix	25 primer tumor	Jobb oldali primer tumor vs. jobb oldali egészséges mucosa	118 elkülönítő gént azonosítottak	
Demtroder		2	20 ogászságos mucoso	Bal oldali primer tumor vs. bal oldali egészséges mucosa	186 elkülönítő gént azonosítottak	
			20 egeszseges mucosa	Jobb vs. baloldali primer tumor	44 elkülönítő gént azonosítottak	
Kita	2006	5 Affymetrix	12 lapos adenoma	Lapos adenoma vs. egészséges mucosa	180 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR
			12 távoli ogázzázos mussos	Baloldali lapos adenoma vs. baloldali egészséges mucosa	49 elkülönítő gént azonosítottak	
			12 tavon egeszseges mucosa	Jobboldali lapos adenoma vs. jobboldali egészséges mucosa	89 elkülönítő gént azonosítottak	
Groene	2006	Affymetrix	36 primer tumor	Dukes' B és C stádium molekuláris osztályozása	45 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR
Dionohini	2007		25 primer tumor Karcinóma vs. egészsé	Karcinóma vs. egészséges	584 elkülönítő gént	RT-PCR, WB, HC
Diancinini	2007	cDNS	13 egészséges mucosa	mucosa	azonosítottak	
Grada	2007	Oligonucleotid	73 primer tumor	Karcinóma vs. egészséges	17 elkülönítő gént	
Glade	2007	microarray	30 egészséges mucosa	mucosa	azonosítottak	KI-FCK
		007 cDNS	18 primer tumor		89 elkülönítő gént azonosítottak	
Kleivi	2007		4 máj metasztázis	Primer tumor vs. metasztázis		RT-PCR
			4 karcinomatózis			

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció
V :	2007	DNG	27 primer tumor	Primar tumor va maataztázia	46 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR
KI	2007	CDNS	27 máj metasztázis	Finner tumor vs. meatsztazis		
Lin	2007	cDNS	48 primer tumor	Drimon tumon vo mostartázia	778 elkülönítő gént azonosítottak	DT DCD
			28 máj metasztázis	Timer tumor vs. meatsztazis		KI-PCK
Croner	2008	Affymetrix	80 különböző stádiumú primer adenokarcinóma	Molekuláris osztályozás	50 elkülönítő gént azonosítottak	Független klinikai tanulmány
Kim	2008	Oligonucleotid microarray	5 fogazott adenoma hozzátartozó egészséges mucosa	Fogazott adenoma vs. egészséges mucosa	124 elkülönítő gént azonosítottak	RT-PCR

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció
Bertucci	2004	cDNS	22 primer tumor	Drognózia moghatározás	194 prognosztikus gént	ШС
Dentucci	2004	CDNS	23 egészséges mucosa	Tiognozis megnatarozas	azonosítottak	ше
Wang	2004	Affymetrix	74 primer tumor (Dukes' B)	Prognózis meghatározás (Dukes' B)	23 prognosztikus gént azonosítottak	_
Eschrich	2005	cDNS	75 különböző stádiumú primer adenokarcinóma	Prognózis meghatározás (Dukes' B és C)	43 prognosztikus gént azonosítottak	-
D'Arrigo	2005	cDNS	10 primer metasztatikus tumor 10 primer nem metasztatikus tumor	Prognózis meghatározás (metasztatikus potenciál)	29 prognosztikus gént azonosítottak	RT-PCR
Arango	2005	Affymetrix	281 primer tumor (Dukes' C)	Prognózis meghatározás (Dukes' C)		RT-PCR
Barrier	2005	Affymetrix	12 primer tumor 12 hozzátartozó egészséges mucosa	Prognózis meghatározás	47 prognosztikus gént azonosítottak	_
Barrier	2005	Affymetrix	18 primer tumor (Dukes' B és C)	Prognózis meghatározás (Dukes' C)	70 prognosztikus gént azonosítottak (tumor esetén). 194 prognosztikus gént azonosítottak (normál	_
			nozzatartozo egeszseges mucosa	mucosa esetén)	mucosa esetén)	

Predikció meghatározás vastagbélrákban (Nannini et al. 2009 alapján):

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció
Barrier	Barrier 2006 Affyma		50 primer tumor (Dukes' B)	Prognózis meghatározás	30 prognosztikus gént	_
Darrier	2000	mymetrix	50 primer tunior (Dukes D)	(Dukes' B)	azonosítottak	
Borrior	Barrier 2007 Affymetrix		etrix 24 primer tumor (Dukes' B)	Prognózis meghatározás	70 prognosztikus gént	
Damer				(Dukes' B)	azonosítottak	—
			24 hozzátartozó normál mucosa			
Covaliari	2007		19 primer tumor (Dukes' C és	Prognózis meghatározás	8 prognosztikus gént	
Cavalleri	2007	CDNS	D)	(Dukes' C és D)	azonosítottak	KI-PCK
X7 1	2007	DNS	58 különböző stádiumú primer	Prognózis meghatározás	119 prognosztikus gént	
i amasaki	2007	CDNS	adenokarcinóma	(metasztatikus potenciál)	azonosítottak	—

Predikció meghatározás vastagbélrákban (Nannini et al. 2009 alapján) folytatása

Kezelésre adott válasz	predikciója	vastagbélrákban	(Nannini et al.	2009 alapján):
	1 5	0	\[1.1 /

Szerző	Év	Platform	Minták	Tanulmány tervezet	Eredmények	Validáció
Mariadasar	2002	-DNC	In stitut	5-FU kezelésre adott válasz predikció	50 elkülönítő gént azonosítottak	
Mariadason	2003	CDINS	<i>IN VIIFO</i>	CPT-11 kezelésre adott válasz predikció	149 elkülönítő gént azonosítottak	_
Arango	2004	cDNS	In vitro	Oxaliplatin kezelésre adott válasz predikció	80 elkülönítő gént azonosítottak	_
Shimizu	2005	cDNS	In vitro	5-FU kezelésre adott válasz predikció	81 elkülönítő gént azonosítottak	_
Ghadimi	2005	cDNS	30 előrehaladott rektális tumor	Preoperatív kemoterápiára adott válasz predikció	54 elkülönítő gént azonosítottak	_
Del Rio	2007	Affymetrix	21 primer előrehaladott tumor	FOLFIRI kezelésre adott válasz predikció	80 elkülönítő gént azonosítottak	_
Khambata- Ford	2007	Affymetrix	80 metasztatikus lesio	Cetuximab kezelésre adott válasz predikció	Epiregulin és amphiregulin expresszió	RT-PCR
Kim	2007	Affymetrix	31 előrehaladott rektális tumor	Preoperatív kemoterápiára adott válasz predikció	261 elkülönítő gént azonosítottak	_
Rimkus	2008	cDNS	43 előrehaladott rektális tumor	Preoperatív kemoterápiára adott válasz predikció	42 elkülönítő gént azonosítottak	_

MELLÉKLETEK II.

Az összehasonlításban a két microarray mintasorozat közös eredményét szemléltetjük az első képen, a RT-PCR-es mintasorozatot a második képen, a két microarray mintasorozat eredményét a harmadik és negyedik képen.

SLC7A5:



Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák








Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák





Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák

CA7:



Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák

CHI3L1:







Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák









Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák

COL12A1:







Ad-hgd: high-grade diszplasztikus adenoma, CRC-AB: korai vastagbélrák