

MikroRNS eltérések vizsgálata a vastagbél-daganat kialakulása során

Doktori értekezés

Nagy Zsófia Brigitta

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András, az MTA Doktora, egyetemi tanár
Dr. Maléth József, Ph.D. Tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára, Ph.D. habil. egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
2. BEVEZETÉS.....	8
2.1. A vastagbél szövettani szerkezete	8
2.2. A vastagbél szövettani elváltozásai	9
2.2.1. A vastagbél adenómák és daganatok epidemiológiája	9
2.2.2. A vastagbél jóindulatú elváltozásai, az adenómák	10
2.2.3. A vastagbélrák patológiai stádiumai	11
2.2.4. A vastagbélrák molekuláris jellemzői	12
2.2.4.1. A mikroszatellita stabil (MSS) fenotípusú karcinóma kialakulása	12
2.2.4.2. Mikroszatellita instabil (MSI) fenotípusú vastagbélrák	15
2.2.4.3. Epigenetikai elváltozások.....	16
2.3. A mikroRNS-ek (miRNS)	16
2.3.1. A miRNS-ek bioszintézise	17
2.3.2. A miRNS-ek nevezéktana	21
2.3.3. A miRNS-ek vizsgálati módszerei	22
2.3.3.1. miRNS-ek kinyerése szövetekből	23
2.3.3.2. Microarray technológia	25
2.3.3.3. A polimeráz láncreakció (PCR) alapú vizsgálatok.....	26
2.3.4. A mikroRNS-ek szerepe a daganatos megbetegedésekben.....	28
2.3.5. A véráramban keringő extracelluláris miRNS-ek	32
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	34
4. MÓDSZEREK.....	35
4.1. Klinikai mintagyűjtés és feldolgozás	35
4.1.1. Biopsziás és műtéti szövetminták.....	36
4.1.2. Plazmaminták	36
4.1.3. FFPE minták	36

4.2. Vastagbélrák és adenóma szövetminták miRNS expressziós profiljának meghatározása	37
4.2.1. Mintagyűjtés	37
4.2.2. RNS izolálás	38
4.2.3. A kinyert RNS minőségi és mennyiségi vizsgálata.....	39
4.2.4. miRNS expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával	39
4.2.5. mRNS expressziós vizsgálat Human Transcriptome Array 2.0 rendszeren	40
4.2.6. A microarray vizsgálatok statisztikai elemzése.....	41
4.2.7. A biopsziamintákon vizsgált valós-idejű kvantitatív PCR analízise	41
4.2.8. <i>In silico</i> miRNA-mRNS target predikció	43
4.2.9. A ciklin D1 immunhisztokémiai vizsgálata.....	43
4.3. miRNS-profil vizsgálat párosított plazmamintákon	44
4.3.1. miRNS izolálás plazmamintákból	44
4.3.2. miRNS expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával	44
4.3.3. A microarray vizsgálatok statisztikai elemzése.....	44
4.3.4. Valós-idejű kvantitatív PCR analízis.....	44
4.4. miRNS és teljes RNS frakciót izoláló módszerek hatékonyságának összehasonlító vizsgálata FFPE szövetmintákon	45
4.4.1. Mintagyűjtés	45
4.4.2. RNS kinyerése miRCURY™ RNA - Tissue Izoláló Kit felhasználásával ...	45
4.4.3. RNS kinyerése High Pure miRNA Izoláló Kit felhasználásával.....	46
4.4.4. RNS izolálása High Pure RNA Paraffin Kit felhasználásával	46
4.4.5. RNS izolálása MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit felhasználásával	47
4.4.6. A kinyert RNS minőségi és mennyiségi vizsgálata.....	47
4.4.7. Valós idejű kvantitatív PCR analízis	47
4.4.8. A referencia miRNS kiválasztása	47
5. EREDMÉNYEK.....	48
5.1. A miRNS kifejeződés microarray-alapú vizsgálata vastagbél szövetmintákban .	48

5.2. <i>In silico</i> célpont mRNS predikció és validáció Human Transcriptome Array 2.0 microarray rendszeren	53
5.3. A megváltozott kifejezésű miRNS-ek jelátviteli útvonalakban betöltött szerepének <i>in silico</i> vizsgálata.....	54
5.4. A ciklin D1 fehérje kifejeződésének vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel	56
5.5. A szöveti- és plazmamintákban megváltozó miRNS expresszió vizsgálata	57
5.6. A miRNS expressziós eltérések valós-idejű PCR-rel történő megerősítése plazmamintákban.....	60
5.7. Plazmaspecifikus miRNS expresszió a párosított szövetmintákban	61
5.8. Az eltérő módszerrel kivont RNS minták koncentrációjának és integráltságának vizsgálata FFPE mintákon	63
5.9. A miRNS profil vizsgálata Exiqon PCR Paneleken a négy különböző módszerrel történő RNS izolálást követően	66
5.9.1. A vastagbél-specifikus miRNS-ek összehasonlító elemzése.....	69
6. MEGBESZÉLÉS	73
6.1. A különböző betegcsoportokban kifejeződő miRNS-ek vizsgálata microarray módszerrel	73
6.2. <i>In silico</i> target mRNS predikció és validáció Human Transcriptome Array 2.0 microarray rendszeren	77
6.3. A ciklin D1 fehérjekifejeződésének vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel	77
6.4. A különböző diagnosztikai csoportokban megváltozó miRNS expresszió vizsgálata plazmamintákban.....	78
6.5. Az eltérő módszerekkel izolált FFPE minták RNS koncentrációjának és integritásának vizsgálata.....	82
6.5.1. A vastagbél-specifikus miRNS-ek összehasonlító elemzése.....	84
6.6. Legfontosabb új megállapítások és megfigyelések.....	85
7. KÖVETKEZTETÉSEK	87
8. ÖSSZEFOGLALÁS	88
8.1. Magyar összefoglaló.....	88
8.2. Summary.....	89
9. IRODALOMJEGYZÉK	90
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	113

10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	113
10.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények	113
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	115
12. FÜGGELÉK	117

1. RÖVIDÍTÉSJEYZÉK

ADT - tubuláris adenóma

ADTV - tubulovillózus adenóma

AGO 1-4 - argonauta család

Akt1 - AKT szerin/threonin kináz 1

APC - Adenopolyposis coli

BARX2 - BarH-szerű homeobox 2

BAT - 25,26 - Big Adenine Tract 25 és 26

BAX - BCL2 asszociált X, Apoptózis Regulátor

CCND1 - ciklin D1

CCR4-NOT - C-C motívumú kemokin receptor típus 4 transzkripciós komplex

CDC25A - sejtosztódási ciklus 25A (Cell Division Cycle 25A)

CDC42 - sejtosztódási ciklus 42 (Cell Division Cycle 42)

CDKN2B - ciklin dependens kináz gátló 2B

cDNS - komplementer DNS

CGH - összehasonlító genomikus hibridizáció (comparative genomic hybridisation)

CIN - kromoszóma instabilitás

CLL - krónikus limfoid leukémia

CRC - vastagbélrák

DCC - deleted in colorectal cancer

DGCR-8 - DiGeorge syndrome critical region gene 8

DICER - Dcr-1 homológ

E2F1 - E2F transzkripciós faktor 1

E2F3 - E2F transzkripciós faktor 3

EGFR - epidermális növekedési faktor receptor

eIF-4E - eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E

ENTPD5 - ektonuklelid trifoszfát difoszfohidroláz 5

ERK5 /MAPK7 - mitogén aktivált protein kináz 7

Ex - Exiqon miRCURY RNS izoláló kit

FFPE - formalin-fixált, paraffinba ágyazott

FMO4 - flavin tartalmú monooxygenáz 4

FOXO1 - villásfejű boks O1 (Forkhead Box O1)

FOXO3A - villásfejű boks O1 (Forkhead Box O1)

FSCN1 - fascin actin-kötegelőfehérje 1 (Fascin Actin-Bundling Protein 1)
GO - gén ontológia konzorcium
GSK-3 β - glikogén-szintáz-kináz-3 β
HIF1A - hipoxia indukálható faktor 1 alfaalegység
hMLH1,3 - MutL homológ 1 és 3
hMSH2,3,6 - MutS homológ 2, 3 és 6
HNPCC - nem-polipos vastagbélrák
HPm - High Pure miRNA izoláló kit
HPp - High Pure Paraffin izoláló kit
HTLV-I - humán T-sejt limfotrópikus vírus típus 1
IGF1R – inzulinszerű növekedési faktor 1 receptor
IGF2R - inzulinszerű növekedési faktor 2 receptor
INP1 - örökölhető peroxiszóma fehérje 1 (inheritance of peroxisomes protein 1)
INPP4B - inozitol polifoszfát-4-foszfátáz II.B. típus
KEGG - Gének és genomok kiotói enciklopédiája (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
KLF4 - kruppel-szerű faktor 4
KRAS - Kirsten rat szarkóma virális onkogén homológ
L1CAM - L1 adhéziós molekula
LEF - T-sejt-specifikus transzkripció faktor 1
LASP1 - LIM és SH3 fehérje 1
LNA - Locked Nucleic Acid
MAPK - mitogén-aktivált protein kináz
MMR - mismatch javító gének
MP - MagNA Pure 96 Cellular RNA LV izoláló Kit
MSI - mikroszatellita instabilitás
MSI-H - magas szintű stabilitás
MSI-L - alacsony szintű stabilitás
MSS - mikroszatellita stabil
N - egészséges minta
NPM1 - nukleofoszmin
NRAS - neuroblasztóma RAS virális (V-Ras) onkogén homológ
O⁶-MGMT - O⁶-metilguanin-DNS metiltranszferáz
ORF - nyitott leolvasási keret

PCDC4 - programozott sejthalál fehérje 4

PI3K - foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz

PTEN - foszfatáz és tenzin homológ

PTGDR - proszttaglandin D2 receptor

qRT-PCR - kvantitatív, valós-idejű polimeráz láncreakció

RASA1 - RAS P21 fehérje aktivátor 1

RhoBTB1 - Rho-kapcsolt BTB Domain-t tartalmazó 1 (Rho Related BTB Domain Containing 1)

RISC - miRNS-indukált csendesítő komplex

RS1 - retinoschisin 1

RT - reverz transzkripció

SCS - multipotens őssejtek

SNORD38 - kis sejtmag RNS (small nuclear RNA)

SNORD49A - kis sejtmag RNS (small nuclear RNA49A)

T - tumoros minta

TCF - T-sejt-specifikus transzkripció faktor 1

TGFBR2 - transzformáló növekedési faktor béta receptor 2

TGFBR3 - transzformáló növekedési faktor béta receptor 3

TP53 - tumor protein P53

TRBP - Tar RNS-kötő fehérje

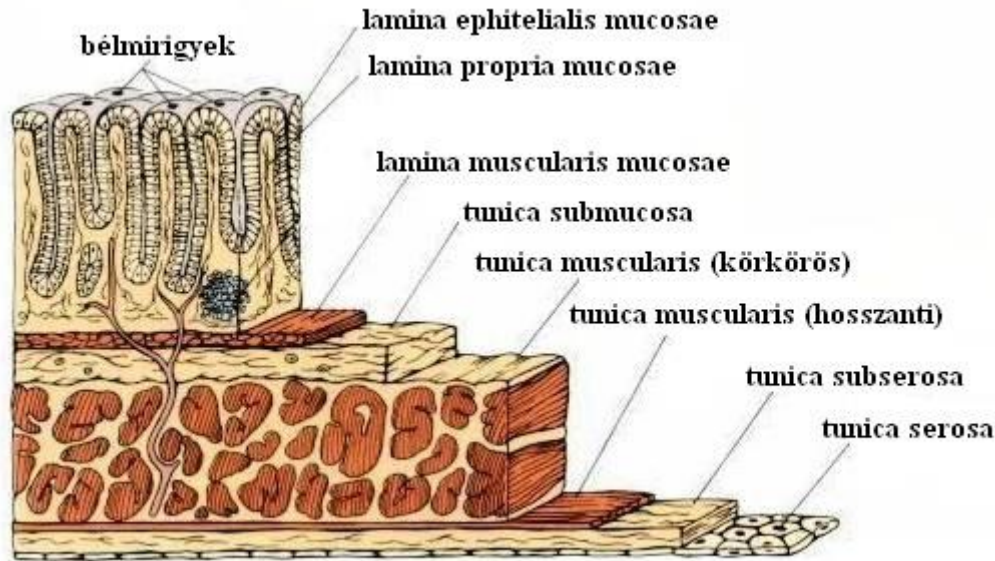
U6 - U6 kis sejtmag RNS

2. BEVEZETÉS

2.1. A vastagbél szövettani szerkezete

A vastagbél feladata a víz, az ionok és az ásványi sók felszívása a lumenből. A vastagbél vakbélre (coecum), felszálló (colon ascendens), haránt (colon transversum) és leszálló (colon descendens) vastagbélre, valamint szigmabélre (colon sigmoideum) és végbélre (rectum) és végbélnyílásra (anus) osztható. A vastagbél falát szerkezete alapján több részre oszthatjuk. A bél lumene felől a nyálkahártya (tunica mucosa), a nyálkahártya alatti réteg (tunica submucosa), izomréteg (tunica muscularis), savós hártya alatti réteg (tunica subserosa) és a savós hártya (tunica serosa) különíthető el. A nyálkahártyát vérerekben, idegekben és kötőszövetekben gazdag vékony submucosa réteg veszi körbe. Az izomréteg belső körkörös és külső hosszanti izmokból épül fel. A vizcerális izomsejtek összehúzzák és mozgatják a béltraktust. A legkülső réteg a serosa, amely vizes savós folyadékot termel, ezáltal védi a belek külső felszínét.

A nyálkahártya (tunica mucosa) fő funkciója a védelem, felszívás és szekréció; további három rétegből épül fel: lamina epithelialis mucosae, lamina propria mucosae és lamina muscularis mucosae (1. ábra). A hámban nincsenek bélbolyhok, felszínén csillószőrös hengerhám található. A hámréteg kesztyűujj-szerűen betűrődik a bél falába, az így létrejött képződményt Lieberkühn-kriptáknak nevezzük. Az epitéliumot enterocyták, nyálkatermelő goblet sejtek és entero-endokrin sejtek alkotják. A kripták sejtjeinek utánpótlásáért a multipotens őssejtek (SCS) felelősek. Az aszimmetrikus osztódásuk során egyrészt megújítják önmagukat, másrészt progenitor sejt populációt hoznak létre, amelyek a kripták apikális régiója felé vándorolva tovább osztódnak és differenciálódnak a bélfal különböző sejttypusaivá [1]. Ez a folyamat fiziológiás esetben egyensúlyban van a nyálkahártya felületéről leváló és elhaló sejtek mennyiségével, azonban ha a folyamat a sejtosztódás irányába eltolódik, úgy sejtszaporulatok, polipok alakulhatnak ki, amelyek akár a daganatképződés kiindulási állapota lehetnek.



1. ábra. A vastagbél szerkezete. (forrás: Chung és Emmanuel nyomán [2])

2.2. A vastagbél szövettani elváltozásai

2.2.1. A vastagbél adenómák és daganatok epidemiológiája

A vastagbélrák a harmadik leggyakoribb ráktípus és a negyedik leggyakoribb daganat okozta elhalálozás világszerte, körülbelül 1-2 millió új megbetegedést és 600 000 halálesetet regisztrálnak évente [3]. Az ötven évnél fiatalabbak esetén az incidencia alacsonyabb, amely a kor előrehaladtával fokozódik. A diagnózis medián életkora a fejlett országokban 70 év. A legnagyobb előfordulást Európa országaiban, Észak-Amerikában és Óceániában mérték, míg néhány déli és közép-ázsiai országban, valamint Afrikában az incidencia alacsonyabb. Az utóbbi években azonban a korábban alacsony kockázatú országokban, mint Spanyolországban vagy kelet-európai és -ázsiai országokban is gyors növekedést figyeltek meg, amelyet a szakirodalom az étkezési szokások megváltozásával és az ún. nyugati életforma kockázati tényezőivel (pl. mozgásszegény életmód, fokozott kalóriabevitel) hoz összefüggésbe [4]. A vastagbélrák komoly népegészségügyi problémát jelent Magyarországon is, évente 9000 új megbetegedést és 5000 új halálesetet regisztrálnak [5].

Az adenómák a leggyakoribb neoplasztikus elváltozások, amelyek a vastagbélben megtalálhatóak, azonban az irodalomban kevés epidemiológiai adat áll rendelkezésre. Egyes tanulmányok vizsgálták már az adenómák előfordulási gyakoriságát 50 évnél

fiatalabb egyéneknél és eredményükben arról számoltak be, hogy már a fiatalabb generációban is detektálhatóak tubuláris adenómák és hiperplastikus polipok [6].

A vastagbélrák molekuláris patogenezise igen heterogén [7]. A vastagbélrák örökletes formáinak molekuláris hátterének feltárása nagy szerepet kapott az utóbbi évtizedekben, amikor a molekuláris patogenezis elterjedésével könnyebbé vált a helyes prognózis felállítása és a megfelelő terápiás válasz kiválasztása [8].

2.2.2. A vastagbél jóindulatú elváltozásai, az adenómák

A vastagbélrákok morfológiai elemzésekor ki kell térnünk a vastagbél-nyálkahártya jóindulatú daganatos elváltozásaira is. A makroszkóposan jól elkülönülő polipoknak egyik alcsoportját képezik a sporadikus adenómák. Szövettanilag három típusa ismert: tubuláris adenóma, villózus adenóma, tubulovillózus adenóma.

A tubuláris adenómák a colon bármelyik részén kialakulhatnak, de leggyakrabban a szigmában és a rectumban találhatók. Az életkor előrehaladtával számuk megnő. Az esetek felében egy elváltozás észlelhető, a fennmaradó részben egyszerre kettő vagy több lézió található a bélben. Eltérő kiterjedéssel jellemezhetők, attól függően, hogy szesszilisek vagy vékony kocsányon ülő alakzatok. A szövettani vizsgálatok alapján a nyelet ép vastagbél nyálkahártya, a fejet pedig neoplasztikus változata borítja, utóbbiban található elágazódó mirigyek sötétben festődnek, rendezetlenek nyáktermelő vagy nyáktermelést nem mutató sejtek bélelik. A diszplázia mértéke és kiterjedése tághatárok között változhat, legsúlyosabb változataik a szubmukózát infiltráló invazív karcinómák [9].

A villózus adenómák a nagyobb méretű és veszélyesebb polipok közé tartoznak. Főleg a rectumban és a szigmában lokalizálódnak. Rendszerint szesszilis, maximum 10 cm átmérőjű, karfiolszerű idegenszövet-szaporulatok, amelyek az ép nyálkahártya felszínétől 1-3 cm-re kiemelkedve a lumenbe domborodnak. A diszplázia mértéke nagyon változó lehet, az invazív karcinómák előfordulása akár a 40%-ot is elérhetik [9].

A tubulovillózus adenómák a tubuláris és villózus komponenseket változó arányban tartalmazó polipoid képletek. Jellemzőek a nyeles vagy szesszilis formák jelenléte [9].

2.2.3. A vastagbélrák patológiai stádiumai

A vastagbél daganatokat differenciáltsági fokuk alapján osztályozhatjuk. A klinikai gyakorlatban használt stádiumokat Dukes [10] leírása, majd Astler és Coller [11] átdolgozása alapján napjainkban is használatosak:

- Dukes A: a daganat a mukózát érinti
- Dukes B1: a tumor betérjed a lamina muskuláris propriába, de nem töri át
- Dukes B2: a tumor betérjed a subszerózába, nincs nyirokcsomó érintettség
- Dukes C1: a tumor a muskuláris propria rétegbe ér, nyirokcsomó érintettség van
- Dukes C2: a daganat áttöri a szerózát, nyirokcsomók érintettek
- Dukes D: távoli metasztázisok kialakulnak

Egy másik javasolt és széles körben használt klasszifikáció a TNM-rendszer, amely a primer tumor (T0,1,2,3,X) a nyirokcsomók (N0,1,2,X) és a metasztázisok (M0,X) alapján sorolja be a daganatot (1. táblázat).

1. táblázat. A vastagbél daganatok stádiumai

TNM beosztás	Kritériumok	Dukes besorolás	Astler-Coller Besorolás
Tis N0 M0	In situ karcinóma, mukózára korlátozódik	-	-
T1 N0 M0	T1 tumor szubmukózába terjed	A	A
T2 N0 M0	T2 tumor muskuláris mukózába terjed	A	B1
T3 N0 M0	T3 tumor szubszerozán túl terjed	B	B2
T4 N0 M0	tumor a környező szervekbe terjed, a vizcerális peritoneumot is eléri	B	B3
T1-2 N1 M0	N1 a környező nyirokcsomók közül 1-3 érintett	C	C1
T3-4 N1 M0	N1 a környező nyirokcsomók közül 1-3 érintett, T3, T4	C	C2,C3
T_{bármelyik} N2, M0	N2 a környező nyirokcsomók közül 4 vagy több érintett, T _{bármelyik}	C	C1,C2,C3
T_{bármelyik} N_{bármelyik} M1	M1 távoli metasztázis, T _{bármelyik} , N _{bármelyik}	-	D

2.2.4. A vastagbélrák molekuláris jellemzői

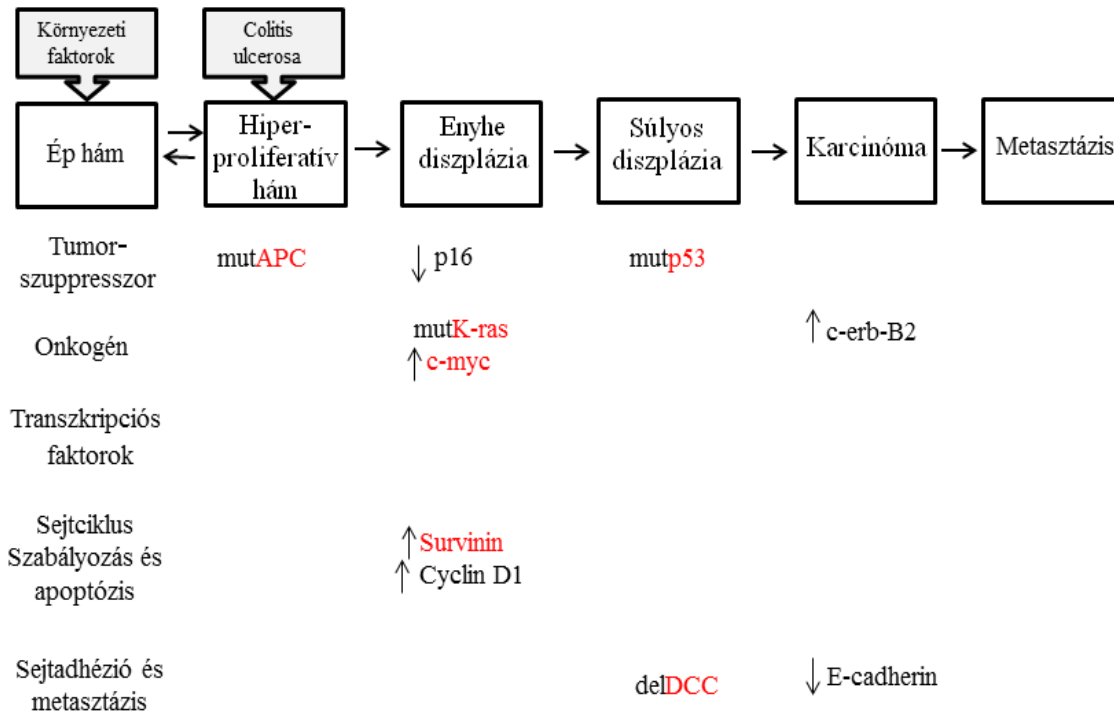
Az ép vastagbél nyálkahártya sejtjeiben bekövetkező daganatos elváltozások háttérben génmutációk, epigenetikai módosulások vagy bizonyos gének promóter régiójában jelentkező hipermetiláció állhat. Ezen folyamatok összessége szabja meg a karcinogenezis folyamatát. A fejlődésmenet során a mutációk számának növekedésével a genetikai instabilitás is fokozódik. A gyakori mutációk sokszor a mikroszatellita instabilitások (MSI) mellett fordulnak elő. A mikroszatelliták rövid, tandem ismétlődő DNS-szekvenciák szerte a genomban. Mikroszatellita instabilitásról akkor beszélhetünk, amikor replikációs hiba miatt hosszuk megnyúlik vagy megrövidül. A károsodott sejtekben bekövetkező jelenséget a mismatch repair gének (*MMR*) elsődleges meghibásodása okozza [12]. A *MMR* rendszer 7 fő génjét ismerjük: *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* és *hPMS2* [13]. Helyes működésük során a DNS-polimeráz által generált hibákat javítják a mikroszatellita szekvenciákban. A mikroszatellita státusz a vizsgált lókuszok (Big Adenine Tract [*BAT*]-25, *BAT*-26, *D2S123*, *D5S346*, és *DI7S250*) alapján az alábbi csoportokra osztható:

- a mikroszatellita stabilitás (MSS) esetén a lókuszokon nincs instabilitás;
- alacsony szintű instabilitás (MSI-L) esetén a lókuszok kevesebb, mint 40%-a mutat instabilitást;
- magas szintű instabilitás (MSI-H) esetén az említett lókuszok több mint 40%-a mutat instabilitást.

2.2.4.1. A mikroszatellita stabil (MSS) fenotípusú karcinóma kialakulása

Korábban megfigyelték, hogy a vastagbél karcinómák adenomatózus diszpláziákon keresztül alakulnak ki [14]. Az adenóma stádiumot pedig hiperproliferatív nyálkahártya elváltozás előzi meg, amelyet előre programozott szabályozó folyamatok vagy környezeti faktorok indítanak el. Fearon és Vogelstein publikálták először az adenóma-karcinóma szekvencia kifejezést 1990-ben. Tanulmányukban a vastagbélrák kialakulásában akkor ismert molekuláris elváltozások sorrendjét ismertették [15]. Akkori ismereteik – kiegészítve a legújabb eredményekkel – általánosságban alkalmazhatóak az MSS típusú vastagbélrákokra (2. ábra). Az útvonalat mérföldkönek tekintik, ugyanis a kolorektális karcinómák 80%-ában kimutathatóak. Általánosságban elmondható, hogy a vastagbélrák kialakulásának kezdeti lépése az adenopolyposis coli

(*APC*) gén mutációja, amely egyike a CRC-ben – korai lépésben – gyakran mutált géneknek, amelyeket “kapuőrző” géneknek hívnak. A sporadikus vastagbélrákok több mint 70%-ában kimutatható mutációja, beleértve a colitis ulcerosa megbetegedésből kialakuló „*de novo*” daganatokat is [8]. Az ép *APC* fehérje a Wnt-jelátviteli útvonal egyik negatív szabályozó eleme. Az útvonalban az *APC* a β -cateninrel a glikogén-szintáz-kináz-3 β -val (*GSK-3 β*) és az axinnal fehérjekomplexet alkotva szabályozza a β -catenin sejten belüli koncentrációját [16]. Nem stimulált sejtekben a *GSK-3 β* elősegíti az axin foszforilációját, ami a β -catenin foszforilációjával közvetetten lehetővé teszi a β -catenin fehérje *APC*-függő degradációját. A β -catenin olyan citoplazmában lokalizálódó fehérje, amelynek többféle funkciója van. A szabad β -catenin bejut a sejtmagba ahol a T-sejt faktor/lymphoid-enhancer faktor (*TCF/LEF*) transzkripciós rendszerrel komplexet képezve aktiválja azt és további gének átírását serkenti. A nem kóros Wnt-szignál meggátolja az aktin foszforilációját, aminek következtében a β -catenin kiszabadul a komplexből és szabályozza a sejtproliferációt. Az *APC*, axin vagy a *GSK-3 β* mutációja fehérjeszerkezet változással és funkcióvesztéssel társul, ami megakadályozza a β -catenin bekötődését az *APC-GSK-3 β* -axin komplexbe. A degradáció hiányának következtében a β -catenin felszaporodik a citoplazmában, és a sejtmagban előidézi a *TCF/LEF*-függő transzkripció szabályozatlan aktivációját.



2. ábra. Az MSS vastagbélrák fejlődésmenete és a legfontosabb génelváltozások (pirossal jelölve) (Forrás: Prof. Dr. Tulassay Zsolt nyomán [17])

Az adenóma-karcinóma szekvencia kialakulásához sok esetben a Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (*KRAS*) onkogén mutációja is hozzájárul. Az esetek 40-50%-ánál kimutatható és már enyhe diszpláziás adenómákban is megjelenik (2. ábra). A *KRAS* egy protoonkogén GTP-kötő fehérje, amely GTP-kötött állapotban aktív. Számos szignáltranszdukciós útvonalat aktivál, köztük a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat is. Ismert, hogy a mutált *KRAS* hiperplasztikus növekedést indukál a vastagbél epitéliumban (a MEK útvonalon keresztül) és gátolja a differenciációt az *APC*-mutáns vastagbél daganatokban [18]. Továbbá leírták, hogy a gén terméke a hámsejtek polaritását is képes befolyásolni. A *KRAS* génben szerzett mutáció csökkenti az adherens sejtkapcsoló struktúrák által közvetített sejt-sejt kapcsolatokat CRC-ben [19].

A survivin expressziója ép szövetben nem mutatható ki, fokozott működését azonban számos ráktípusban leírták, többek között vastagbél daganatban is. A survivin a sejtosztódás alatt a centroszómához kapcsolódva, a kaspáz-3, kaspáz-9 fehérjékhez kötődve fejt ki antiapoptotikus hatását [20]. Emelkedett kifejeződése összefüggésben áll az apoptózis gátlásával, sejtproliferációval és angiogenezissel is [21].

A deleted in colorectal cancer (*DCC*) tumorszuppresszor gén deléciója a 18q22 kromoszóma régióban lokalizálódik. A vastagbél-daganatok körülbelül 70%-ában kimutatható allélvesztése [22] (2. ábra). A gén az Ig szupercsalád transzmembrán receptorát kódolja, amely az axonfejlődésben valamint az intracelluláris jelátvitelben játszik fontos szerepet [23]. A vad típusú *DCC* génterméke az apoptózis során aktiválhatja a kaszpáz-3-fehérjét. Sejtvonalakon végzett kísérletek során megfigyelték, hogy fokozott expressziója a sejtosztódás során gyors G2/M átmenetet okoz [24].

A p53 fehérjét a *TP53* gén kódolja a 17p13.1. lókuszon. A humán tumorok több mint 50%-ában abnormális az expressziója [25]. Mutációja vagy funkcióvesztése általában az adenóma-karcinóma átmenetnél jelentkezik a Vogelstein-modellben (2. ábra). A léziók progressziójával párhuzamosan a p53-ban is emelkednek az eltérések gyakoriságai. Az adenomák 4-26%-ában, invazív fókuszokkal rendelkező adenomák 50%-ában és a CRC-k 50-75%-ában jelentkeznek az eltérései [26]. A p53 fehérje a sejtciklus G1-es állapotában leállást indukál, hogy elősegítse a DNS javítását a replikálódás során fellépő környezeti és onkogén stressz hatásokkal szemben [27].

2.2.4.2. Mikroszatellita instabil (MSI) fenotípusú vastagbélrák

Az MSI tumorokat az ezekben a szakaszokban felhalmozódó mutációk (normál sejtekhez képest 100-1000x nagyobb ráta) jellemzik. Az MSI vagy más néven mutátor útvonal a sporadikus vastagbélrákok körülbelül 15-20%-ában jelentkezik.[28]. Az MSI fenotípust az 1990-es évek elején fedezték fel miközben az öröklődő, nem-polipos vastagbélrák (HNPCC) molekuláris genetikai hátterét keresték, amelyet ma Lynch-szindrómának neveznek [29]. Az MSI mértéke attól is függ, hogy milyen gének metiltáltak a tumorban. Az MSI-H típusú sporadikus CRC leggyakoribb okai a *hMLH1* génmutációja vagy promóterének hipermetilációja és a *hMSH2* génben bekövetkező germline mutációja [30]. Az MSI-H típusú sporadikus vastagbél-daganatok nem mutatnak szembevető citogenetikus eltéréseket és aneuploidia sem jellemző rájuk [31]. Az ilyen típusú tumor kialakulását az APC, a K-ras és p53 jelátviteli útvonalakban megváltozott gének csökkent gyakoriságai, mutációi vagy allélvesztései okoznak. Ezen tumorokban az 5q, a 17p és a 18q kromoszómákon a heterozigótaság hiánya is kimutatható [32]. A vastagbél-daganat kifejlődésében szerepet játszó gének (mint a *TGFβRIII* [33], *IGFR2* [34], *BAX* [35], *MSH3* [36], *MSH6* [36], *β-catenin* [37])

mikroszatellita szekvenciáikban azonosítanak mutációkat. Több sporadikus MSI-H rák CpG-szigetein DNS hipermetiláció mutatható ki a metilátor fenotípus miatt [32].

Az MSI-L daganatok hiperplastikus polipokból vagy ún. fogazott (serrated) adenómákból alakulnak ki. Előfordulási gyakoriságukat 15%-ra becsülik. A tumorok közös jellemzői, hogy az 5q, 1p és 8p kromoszóma régiókban heterozigótaság elvesztését lehet kimutatni. Egy bizonyos DNS-javító gén (*O⁶-MGMT*) metilációval történő csendesítése ezekre a tumorokra jellemző a leginkább. A kromoszóma instabilitás miatt aneuploid DNS-tartalom mutatkozik meg. Az MSI-L rákok részben mikroszatellita instabil és kromoszómáisan instabil kevert fenotípust mutatnak, biológiai viselkedésük azonban az MSS tumorokhoz hasonlít [38].

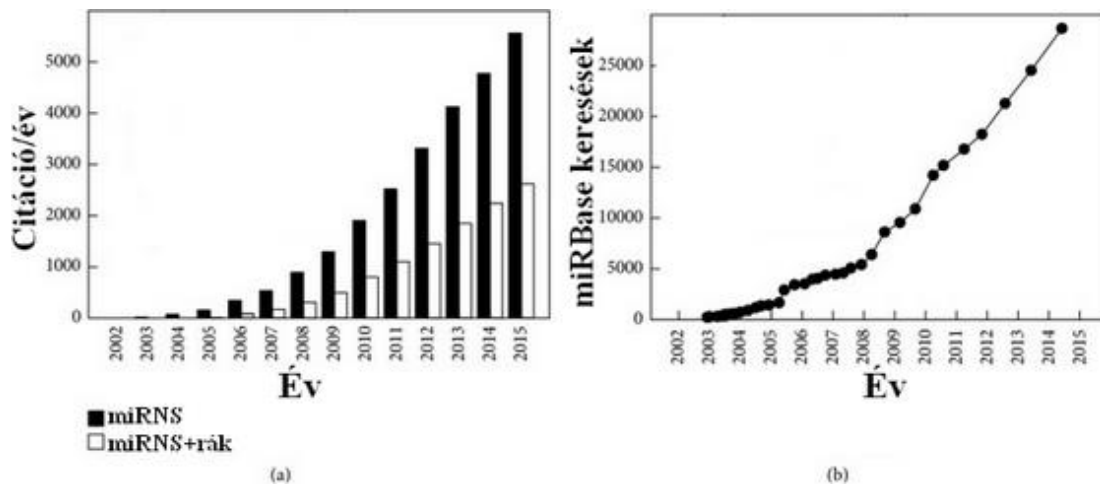
2.2.4.3. Epigenetikai elváltozások

A vastagbélrák kialakulásában egyéb epigenetikai folyamatok is szerepet kapnak. A globális kromoszóma instabilitás kialakulásának hátterében többek között a DNS metiláció állhat. A CRC kialakulásában érintett tumorszuppresszor gének promóter régiójában a hipermetiláció géncsendesítést okozhat, míg a normális esetben inaktivált gének hipometiláció által aktiválódhatnak [39]. A teljes genom egy kis frakciójából átíródó nem-kódoló RNS-ek szintén befolyásolhatják a daganatképződést, közülük is a legismertebb csoportot a miRNS-ek képezik.

2.3. A mikroRNS-ek (miRNS)

Sok éven át a molekuláris biológia centrális dogmája szerint az RNS elsősorban egy köztes információhordozó volt a DNS-szekvencia és a kódolt fehérje állapotok között. A modern biológia egyik legnagyobb felfedezése volt, hogy a teljes humán genom szekvenciájának csupán 2%-át képezik a protein kódoló gének, valamint, hogy a humán genom legalább 90%-a átíródik RNS-sé. Tehát a humán transzkriptóm sokkal komplexebbnek bizonyult annál, mint hogy fehérje kódoló gének és splice variánsaik összessége legyen. Kezdetben azt feltételezték, hogy ezek a szakaszok a korai gének beépüléséből és mobil genetikai elemek inszerciójából összeálló, a genomban felhalmozódott evolúciós törmelékek maradványai. Az újabb bizonyítékok azonban azt sugallták, hogy a nem-kódoló RNS-ek fontos szerepet töltenek be a sejt fejlődésében, fiziológiájában és patológiájában is. A nem-kódoló RNS-eket két nagy csoportba sorolhatjuk a transzkriptum mérete alapján: rövid-, és hosszú nem-kódoló RNS-ekre.

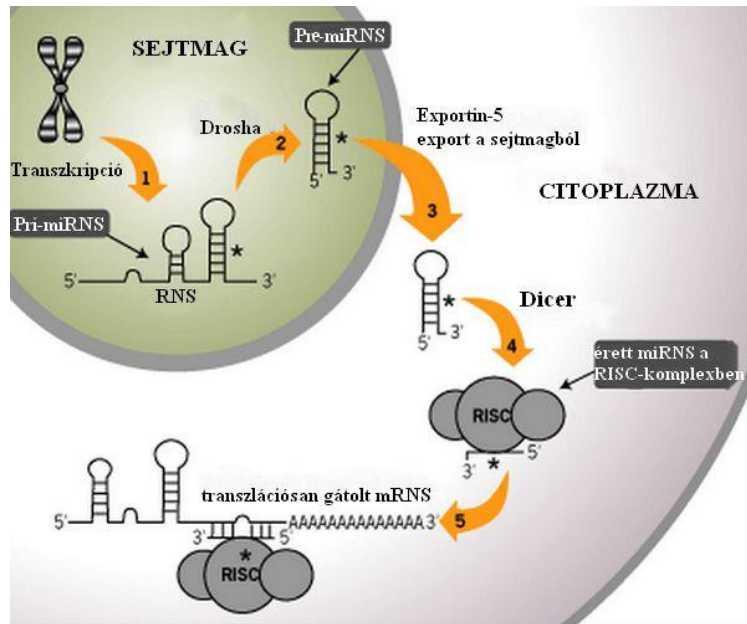
Mindkét osztályt tovább lehet csoportosítani, amelyekben a mai napig újabb és újabb alosztályokat (fedeznek fel és) írnak le. Az elmúlt években a mikroRNS-eknek (miRNS) nevezett rövid nem-kódoló RNS-eket tanulmányozták a leggyakrabban, amelyről a több mint 5000 ezzel foglalkozó citáció is tanúskodik a PubMed adatbázisában (3. ábra). A miRNS-eket Victor Ambros írta le először *Caenorhabditis elegans*-ban. A nem kódoló RNS-ek ezen osztálya olyan 18-25 nukleotid hosszúságú, evolúciósan konzervált, egyszálú RNS-molekulák csoportja, amelyek legfőbb funkciója a génexpresszió szabályozása eukariótákban [40].



3. ábra. A miRNS keresőszó tartalmú publikációk számának változása az elmúlt években. (a) Az alábbi kereső szavakra kapott találatok (Pubmed) száma az adott évben: fekete oszlop: „microRNA” fehér oszlop: „microRNA+cancer. (b) miRBase adatbázisban a keresések számának alakulása 2002. decemberétől 2014. júniusáig (az utolsó verziószámig, release 21) [40].

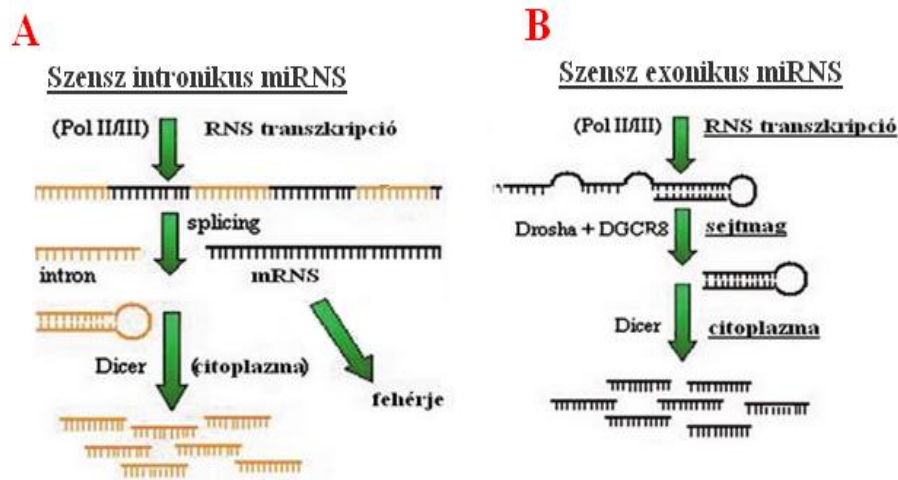
2.3.1.A miRNS-ek bioszintézise

A miRNS-ek biogenezisének folyamata magában foglalja a nukleuszban zajló transzkripciójukat, a sejtmagból a citoplazmába történő exportjukat és az ezt követő további processzási folyamatokat, amelyek a citoplazmában zajlanak (4. ábra).



4. ábra. A miRNS érésének lépései a sejtorganelumokban (Forrás: www.invitrogene.com nyomán).

A legtöbb esetben a miRNS gének transzkripcióját az RNS-polimeráz II katalizálja, amely a hajtú szerkezetű primer miRNS-t (pri-miRNS) szintetizálja. A primer állapot már önmagában tartalmazhatja számos különböző érett miRNS szekvenciáját. A pri-miRNS-ek az mRNS-ekhez hasonlóan rendelkeznek 7-metilguanozin sapkával és poli(A) farokkal, amelyek az RNS-polimeráz II transzkriptumaira általánosan jellemzőek. Ezek a jellegek azonban a további lépéseket követően eltávolításra kerülnek a szekvenciáról [41]. A pri-miRNS-ek független miRNS génekről, intronok vagy exonok részeként íródnak át (5. ábra) [42,43].



5. ábra. A miRNS-ek transzkripciója az intronikus és exonikus genomiális régiókról (Forrás: Sevignani és mtsai. nyomán [44]). Azok a miRNS-ek, amelyek a genom intronikus régiójában kódoltak, az RNS splicing folyamata során különülnek el az mRNA-ektól. (A). Az elhelyezkedésüket tekintve exonikus miRNS-ek a transzkripció folyamán íródnak át a „gazda” génnel együtt, majd a Drosha-DGCR8 enzim hasítását követően pre-miRNS keletkezik (B).

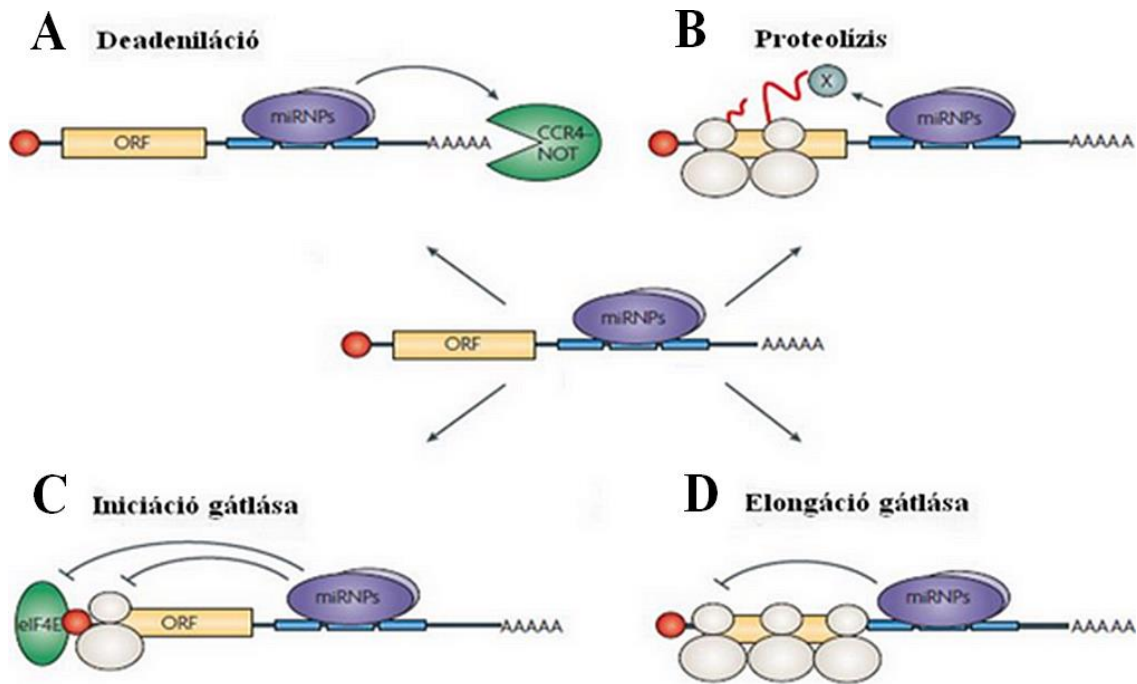
Az emlősöknél az ún. „mikroprocesszáló rendszer” a sejtmagban lokalizálódik, amelynek tagja a Drosha enzim, és kofaktora a DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR-8). A pri-miRNS-ről a DROSHA-DGCR-8 komplex a nukleuszban egy 70 nukleotid hosszúságú köztes terméket hasít ki, amelyet pre-miRNS-nek nevezünk [43]. A felszabaduló pre-miRNS két nukleotid hosszú 3'-túlnyúló véggel rendelkezik [45]. A miRNS bioszintézisének következő lépéseként a pre-miRNS a Ran-GTPáz aktivitású exportin-5 segítségével a citoplazmába kerül, ahol a Dcr-1 homológ (DICER) és kofaktora, a Tar RNS-kötő fehérje (TRBP) hasítja a terminális hurok eltávolításával együtt [43].

Az exportin-5 egy olyan nukleocitoplazmatikus transzport faktor, amely fontos szerepet játszik a miRNS nukleuszból a citoszolba történő exportjában [46]. Az exportin-5 a pre-miRNS „minihélix” motívumát ismeri fel, amely egy 14 bázispárnál nagyobb hurokból és egy rövid 3'-túlnyúló szekvenciából épül fel. Működése függ a kofaktorától, amely RAN-GTP-kötött állapotban specifikus kapcsolódást tesz lehetővé az exportra szánt szubsztráttal [47].

A citoplazmába kijutott dupla szálú pre-miRNS-t az RNáz-III családba tartozó enzim, a DICER hasítja. A DICER egy evolúciósan konzervált fehérje, amelynek jelenlétét először a *Drosophila* fajban írták le, majd emlősökben, növényekben és gombákban is kimutatták [48]. A citoplazmába kijutott pre-miRNS-ből egy 22 nukleotid hosszúságú duplex szerkezetet szabadít fel a terminális hurok kivágásával. A stem-loop szerkezetű pre-miRNS szárain a „G:U” nukleotid párok és nukleotid inszerciók jelenléte miatt tökéletlen bázispárosodások jelennek meg a szekvenciában. A miRNS-miRNS* duplex a termodinamikai stabilitás szabályai alapján vezető és követő szállá (miRNS*) módosul [49,50].

A duplaszálú RNS egyszálúvá történő konvertálása bonyolult folyamat, amelyben RNS-fehérje és fehérje-fehérje kölcsönhatások egyaránt érvényesülnek. A folyamatot végrehajtó ribonukleoprotein központ a miRNS-indukált csendesítő komplex (RISC)-en keresztül zajlik (5. ábra). A cél (target) mRNS-hez történő kapcsolódás a RISC-komplexeen keresztül történik. Emlősökben az Argonauta család (AGO 1-4) tagjai képezik a komplex szerves részét. A Metazoa csoportján belül a miRNS-ek részleges komplementaritáson keresztül kapcsolódnak a cél mRNS szekvenciával. Az egyedüli kivétel a miRNS mag-régiója (2 és 7 nukleotid a miRNS 5'- végétől), ezen keresztül valósul meg a tökéletes antisense bázispárosodás az mRNS szekvenciával. Néhány kivételtől eltekintve a miRNS kötőhelyek az mRNS 3'-UTR (3'- nem transzlálódó) régiójában több kópiában találhatóak meg [43].

Amint a megfelelő szálú miRNS a citoplazmatikus RISC-komplexebe épül, a poszttranszkripció géncsendesítés végbemehet. Két fő módon valósulhat meg a folyamat: a target mRNS degradációján és a transzláció gátlásán keresztül. A kialakult miRNS komplex több szinten avatkozhat be a transzlációba. Gátolhatja a transzlációt az iniciáció lépésénél és blokkolhatja a riboszómális alegység kapcsolódását az mRNS-re valamint a szintetizálódó polipeptid lánc korai degradációját és a riboszómák korai leválását is eredményezheti (6. ábra) [51].



6. ábra. A miRNS közvetített poszttranszkripcióis géncsendesítés lehetséges mechanizmusai emlősökben (Filipowicz és mtsai, 2008 nyomán [43]). A mikro-ribonukleoprotein komplex (miRNP) 4 különböző mechanizmussal kötődhet az mRNS-re. A miRNP komplex az mRNS 3'UTR régiójában lévő fehérjékkel kölcsönhatva deadenilációt és mRNS degradációt eredményezhet (A). Transzláció iniciáció gátlás bekövetkezik a 7-metilguanozin sapkát felismerő egység és a 60S riboszóma alegység blokkolásával (C). Egy még azonosítatlan proteáz által a keletkező polipeptid szintjén is történhet hasítás (B) valamint a miRNP elongáció gátlásával (D). A piros kör a 7-metilguanozin sapkát szimbolizálja. (ORF-nyitott leolvasási keret, eIF-4E-eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E, CCR4-NOT kemokin receptor típus 4 transzkripcióis komplex)

2.3.2. A miRNS-ek nevezéktana

A miRNS-ek felfedezésének robbanásszerű növekedésével szükségessé vált egy egységes nomenklatura megalkotása, hogy a nem egyezményes elnevezésből származó félreértések ne merüljenek fel. A miRBase (<http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>) adatbázis alapján az alábbiak szerint különböztetjük meg a miRNS-eket.

Az elnevezésük egy 'mir/miR' előtagot követő kötőjelből és egy számból tevődik össze (pl.: mir-19). A csupa kisbetűvel írt 'mir' az adott miRNS prekursor állapotát jelképezi.

Ez a jelölés nem egyértelmű, hiszen több jelentéssel is rendelkezik. Érthetjük ez alatt a vizsgált miRNS genomban kódoló lókuszt, elsődleges transkriptumát vagy a prekursorát már magában foglaló kiterjesztett hajtú szerkezetet. A nagybetűs forma ('miR') alatt az érett miRNS szálát értjük. A miR előtag utáni sorszám az időrend szerinti publikálásukat takarja.

A miRNS-ek konzerváltsága miatt előfordulhat, hogy más organizmusokban is jelen vannak azonos szekvenciával rendelkező érett miRNS-ek, ebben az esetben a miRNS-eket az adott fajra jellemző hárombetűs előtaggal egészítik ki (pl.: mmu-miR-19:Mus musculus, hsa-miR-19: Homo sapiens).

Előfordulhat, hogy a genom különböző szakaszairól megegyező szekvenciájú érett miRNS íródik át. Ebben az esetben, a már fentebb említett rövidítés után kötőjellel egy újabb sorszám kerül (pl.: hsa-miR-19-1, hsa-miR-19-2). Néhány nukleotid eltérést az azonosító számot követő kis betű különböztet meg, pl.: hsa-miR-19a, hsa-miR-19b.

A hajtúszerkezetről történő átíródás lehetővé teszi, hogy stabil miRNS szintetizálódjon mindkét szálról. A két szálát aszerint különböztetik meg, hogy melyik szál íródik át nagyobb koncentrációban. A kisebb mennyiségben kifejeződő forma csillag indexet kap (pl.: miR-19*). Yang és munkatársai megfigyelték, hogy a csillaggal jelölt alak is funkcióképes lehet [52].

Ha a rendelkezésre álló adatokból nem derül ki, hogy melyik szál a domináns változat, akkor attól függően, hogy az átíródás a szensz vagy az antiszensz prekuzorról íródik át, -5p és -3p kiegészítést alkalmazunk (pl.:miR-19-5p) [53].

2.3.3. A miRNS-ek vizsgálati módszerei

A miRNS-ek számos biológiai folyamat szabályozásában vesznek részt, ezért tanulmányozásuk gyorsan fejlődő kutatási területté nőtte ki magát. Míg a génexpressziós folyamatok vizsgálatára számos módszert ismerünk, addig a miRNS-ek analíziséhez leginkább a microarray, a RT-qPCR és nagy áteresztőképességű szekvenálási módszereket alkalmazunk. Minden egyes módszernek ismerjük az előnyeit és hátrányait, beleértve a szenzitivitását, specificitását és költségeit.

Egészen 2002-ig kevés ismeretünk volt az egészséges és daganatos sejtekben megváltozó miRNS-ek kifejeződéséről. Ennek egyik oka lehetett, hogy a több száz

vizsgálni kívánt miRNS daganatspecifikus expressziós szintjének megállapítása időigényes folyamat, további nehézség volt a kísérletekhez szükséges nagy mennyiségű kiindulási totál RNS megléte.

A legcélszerűbb megoldás a nagy áteresztőképességű módszerek alkalmazása, azon belül is az oligonukleotid microarray-k használata, amelyek előnyösnek bizonyulnak, ha különböző expressziós mintázatokat szeretnénk azonosítani akár nagy mintaszám esetén is. A méréssel olyan célmolekulák válogathatóak ki, amelyek kifejeződése megváltozik adott mintacsoportok között. Ezeknek a célmolekuláknak további vizsgálata javasolt, egyedi megerősítő RT-PCR alapú technikákkal [44].

2.3.3.1. miRNS-ek kinyerése szövetekből

Miközben a miRNS expressziós vizsgálati módszerek jelentős figyelmet kapnak, kevesebben fókuszálnak a minta-előkészítési folyamatokra: a minta kiválasztásra, a szöveti disszekcióra és az RNS izolálásra. Ezek a preanalitikai lépések azonban szintén fontosak. A biológiai mintákból izolált RNS intaktsága befolyásolhatja azoknak a detektáló módszereknek az eredményét, amelyekkel a transzkripciós eltérések azonosíthatók. A jelenség azzal magyarázható, hogy az RNS bomlásából származó rövid fragmentumok befolyásolják a további molekuláris biológiai reakciókat, amelyek a miRNS expresszió alul- vagy túlbecslését eredményezhetik [54].

A legtöbb molekuláris vizsgálat elvégzésére a friss fagyasztott szövetminták lennének ideálisak, azonban ezek nem mindig állnak rendelkezésre. Ebben az esetben az elemzéseket formalinban-fixált, paraffinba-ágyazott (FFPE) mintákon végzik. A szövetek archiválását sztenderd lépések során formalin oldatos (10% formaldehid) fixálással indítják, majd felszálló alkoholsorral dehidratálják, hogy elősegítsék a minta paraffinnal történő tartósítását. A formalin a szövet szerkezete és a sejt fehérjéinek megőrzésében játszik fontos szerepet, azonban jelentősen csökkenti az RNS kihozatal mértékét és minőségét. Az FFPE mintákból az RNS a fixálás hatására kialakuló RNS-fehérje térhálós szerkezet miatt nehezebben kinyerhető, mint a friss fagyasztott szövetekből. A formalin felelős továbbá a bázisok (különösen az adenin) és a monometilol között kialakuló reakcióért is [55,56]. Ez a fajta kovalens módosítás csökkenti a reverz transzkripció hatékonyságát a kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR) során, és a további vizsgálatokra is hatással van [57,58]. A génexpresszió vizsgálatának egy új

megközelítése lehet olyan módszerek (pl. *in situ* hibridizáció) alkalmazása, ahol nem szükséges az RNS izolálása. Ezek az eljárások azonban nem alkalmazhatóak nagy áteresztőképességű analízisekre [59].

Napjainkban elterjedt módszer, hogy a friss szöveteket a mintavételezés után egy ún. RNAlater (ThermoFisher Scientific, USA) konzerváló folyadékba helyezik. A nem toxikus ammónia- és cézium-szulfát tartalmának köszönhetően denaturálja az RNáz és DNáz enzimeket, ezáltal gyorsan stabilizálja a mintában található RNS és DNS molekulákat, így a szövetminták hosszútávú tárolása megvalósulhat. Alkalmazásánál figyelembe kell venni, hogy a szövetek finom anatómiai és szerkezeti jellemzőinek megőrzésére nem alkalmas [60], ezért inkább az RNS vizsgálatokra alapuló módszereknél elterjedt. RNS expresszióra alapuló kísérleteinkben mi is alkalmaztuk ezt a konzerváló eljárását.

A formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövetekben detektálható miRNS-ek stabilitásáról kevés ismeretünk volt a 2000-es évek végéig. Li és mtsai. párosított FFPE és friss fagyasztott sejtvonalból izolált mintákon vizsgálták először a kinyert miRNS-ek felhasználhatóságát. Összesen 160 miRNS expresszióját vetették össze RT-PCR alapú megközelítéssel. Megfigyeléseik szerint több miRNS-t detektálható az FFPE mintákban, mint a friss fagyasztott párokban. A jelenséget egyrészt azzal magyarázták, hogy ugyanannyi mennyiségű RNS kinyeréséhez több FFPE kiindulási anyagra volt szükség, mint a friss fagyasztott mintapárok esetén. Másrészt a miRNS molekulákat kevésbé érintik a fentebb részletezett fixálási folyamatokban bekövetkező változások (pl. metilol- keresztkötések), ezért könnyebben tárhatóak fel a szövetekből. A miRNS-ek stabil expressziós szintet mutattak az archivált FFPE mintákban is, ezért a molekuláris patológiában ideális vizsgálati célpontok lehetnek [61]. Ezt támasztja alá Xi és mtsai. eredménye is, akik a miR-181b expresszióját 10 éves mintákban is ki tudták mutatni [62]. Ezen felül Bovell és mtsai. 6-28 éves FFPE vastagbél-daganatos mintákban stabil miRNS-ek csoportját (miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, miR-203, and miR-324-5p) azonosították, amelyek már klinikai relevanciával is rendelkeztek [63].

A miRNS-ek izolálását a guanidin/fenol/kloroform módszerrel vagy a kereskedelembe kapható, oszlopos- vagy mágnesesgyöngy-alapú izoláló kitékkel végezhetjük. A különböző RNS kinyerési technikák hatékonysága – többek között – PCR, microarray- vagy RNAseq módszerekkel is összehasonlítható, azonban szignifikáns különbségek

adódhatnak az RNS kihozatal minőségében az eltérő kiteket használva [64,65,59,54]. Doleshal és mtsai. a miRNS-ek expressziójában 5-20-szoros eltéréseket detektáltak megegyező kiindulási anyagmennyiség mellett is különböző izolálási módszereket használva [59]. Podolska és mtsai. teljes RNS és miRNS frakciót izoláló módszereket hasonlítottak össze microarray alapú vizsgálatokkal. Eredményeik is a fenti állításokat támasztották alá, a teljes RNS tartalmú mintákban a detektált miRNS-ek magasabb kifejeződést mutattak a rövid RNS tartalmú mintákhoz képest [54]. Guo és mtsai. RNAseq módszerrel vetették össze az RNS kihozatal minőségét, amellyel sikeresen megállapították, hogy az oszlopos-alapú izoláló kittel magasabb read (leolvasási) számot lehet kinyerni, a hagyományos fenol-kloroform izolálási módszerhez képest [65].

2.3.3.2. *Microarray technológia*

A microarray-k olyan miniatűr rendszerek, amelyek lehetővé teszik, hogy egy idő pillanatban egyszerre több ezer gén kifejeződéséről kapjunk információt. Az első géncipek DNS-alapúak voltak, idővel azonban a módszer tovább fejlődött és a Humán Genom Projekt befejeztével már nem csak a teljes genomot érintő génexpressziós profilok készítésére vált lehetőség, hanem génvariációk, epigenetikai és DNS-fehérje kapcsolatok, stb. kimutatására is alkalmazhatóvá vált [66,67]. A szilárd hordozókon (nylon, üveg, szilikon) több ezer ismert sorrendű nukleinsav szekvenciát kötnek, amelyek specifikus próbákként funkcionálnak. A legelterjedtebb gyártók (Agilent, Affymetrix, Illumina) változatai az élőlények génállományának egyes szakaszaira komplementer próbákat tartalmaznak. Amikor a fluoreszcensen jelölt komplementer DNS (cDNS) hibridizálódik a próbákhoz, a génexpresszió számszerűsíthetővé válik egy lézeres leolvasást követően. A szkennel minden egyes próbánál ún. fluoreszcens intenzitás értéket olvas le, amelynek mértéke arányos az adott szekvencia abundanciájával: a gyakori szekvenciákra specifikus fluoreszcens intenzív jelet, míg a ritkébbak gyengébb jelet emittálnak [68].

Az első miRNS microarray kísérletet Liu és mtsai. publikálták 2004-ben. A cipek felületén több száz prekursor- és érett miRNS próbát rögzítettek, amelyekkel humán szövetben expresszázó miRNS mintázatokat lehetett azonosítani [69]. A miRNS-eket biotinnal jelölt random primerekkel reverz transzkripció során cDNS-sé írták át, majd a mintát ezután hibridizáltatták a chip felszínére. A miRNS intenzitását sztreptavidin-

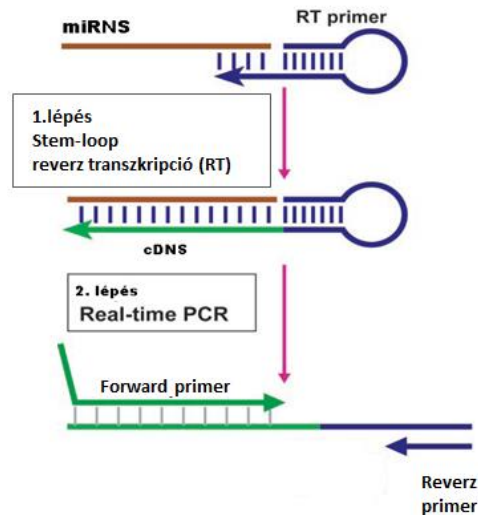
jelölt fluoroflórokkal detektálták. A technológiával sikerült kimutatni, hogy a miRNS-ek is jellegzetes mintázatot mutatnak a rákos szövetekben. A szerzők arra is rávilágítottak, hogy a későbbiekben a detektált miRNS profilokkal akár osztályozhatjuk a már meglévő tumoros elváltozások differenciálódási stádiumait is [44].

2.3.3.3. A polimeráz láncreakció (PCR) alapú vizsgálatok

A miRNS-ek expressziójának nagy érzékenységgel és specificitással történő meghatározásakor az alábbi technikai kihívások jellemzőek:

- az érett miRNS-ek rövidek (~22 nukleotid hosszúságúak);
- GC-tartalmukat tekintve heterogének, ezért a miRNS populáció nukleinsav duplexeinek olvadási hőmérséklete széles skálán mozoghat;
- az érett miRNS-eknek nincs közös szekvenciabeli tulajdonságuk, ami megkönnyítené a szelektív izolálásukat (pl. miRNS-ekre jellemző poli(A)-farok);
- az elsődleges átírat (pri-miRNS) tartalmazza a cél mRNS, a prekursor (pre-miRNS) és az érett miRNS szekvenciáját is.

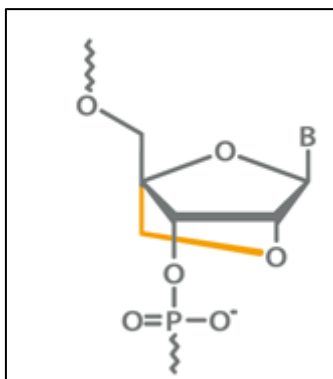
A miRNS-ek kvantitatív RT-PCR-rel történő vizsgálata során az első lépés, hogy az mRNS-t reverz transzkripció segítségével pontosan átírjuk komplementer DNS (cDNS) molekulákká. A hagyományos RT-PCR csak a prekursor miRNS-ek kimutatására képes, míg az ún. stem-loop kvantitatív RT-PCR-rel az érett miRNS-ek is nagy érzékenységgel és specificitással vizsgálhatók. A módszer lényege, hogy az érett, azonban rövid miRNS-ekhez egy specifikus komplementer primer kapcsolódik, ezáltal a reverz transzkripció végbemehet. A különleges oligonukleotid egy dupla szálú (stem) részből és egy hurokból (loop) áll, ami tartalmazza az univerzális primer-kötő szekvenciát. A keletkező cDNS templátként fog szolgálni az RT-PCR-ben, amely során az adott miRNS-re specifikus PCR primer mellett egy – a stem-loop szekvenciára specifikus – univerzális primert használunk. A PCR két lépésben zajlik: az első lépésben reverz transzkripció történik stem-loop struktúrájú primerekkel, a második lépésben a cDNS templát felszaporítása valósul meg (7. ábra).



7. ábra. A stem-loop RT-PCR lépései (Forrás: Chen és mtsai, 2005 nyomán). A reverz transzkripciót valós-idejű PCR lépés követi. Rövidítések: RT-reverz transzkripció; cDNS-komplementer DNS;

Ez a technológia a következő előnyökkel jár: specifikus; képes megkülönböztetni a homológ szekvenciákkal rendelkező miRNS-eket; széles lineáris tartományban detektálható a miRNS koncentráció; rendkívül érzékeny; kis mintamennyiség is elégséges a vizsgálathoz (totál RNS 1-10 ng); akár totál RNS, tisztított RNS és sejtlizátumokon is használható [70].

A PCR technikával történő miRNS detektálásnak az egyik legígéretesebb, de ugyanakkor relatív költséges módja a módosított nukleinsavak alkalmazása, amelyek jelentősen megnövelik az RNS és a próba közti hibridizáció mértékét [71]. Ennek köszönhetően nagyon rövid oligonukleotidok is tervezhetőek a reakciók során. A Locked Nucleic Acid (LNA) nukleozidok olyan módosított nukleotidok, ahol a ribózgyűrűt a 2'-O atom és a 4'-C atom között egy metilén-híd köti össze (8. ábra).



8. ábra. A Locked Nucleic Acid módosított nukleinsav szerkezete (forrás: www.exiqon.com)

Az LNA nukleozidok is az RNS és DNS-ben ismert bázisokat tartalmazzák és a Watson-Crick bázispárosodás szabályai érvényesek rájuk. Az LNA molekula előnye, hogy megnöveli a komplementer bázisok párosodásából létrejött duplexek stabilitását. Az eddig ismert RNS próbákkal szemben sokkal érzékenyebben működik, reakcióját nem befolyásolja a target szekvencia GC tartalma, nehezen kezelhető mintatípusok esetén (pl. testfolyadékok, FFPE blokkok) pedig megnöveli a célmolekula specificitását.

Habár a nukleinsav mennyiségi meghatározásának „gold sztenderd” módszere az RT-qPCR technika, egyik nehézsége a megfelelő belső kontrollok kiválasztása. Az eddigi tanulmányokban használt belső kontrollok variációi alapján kijelenthetjük, hogy nem létezik olyan referencia miRNS, amely minden sejtípusban és eltérő kísérleti körülmények között is stabilan expresszálna a különböző mintákban. A szakirodalom alapján az alábbi miRNS-ek használhatók referenciaként: miR-16, miR-142-3p, 18S rRNA, miR-638, let-7a, miR-1249, miR-295, 5SRNA, U6, U6B, RNU38B, RNU43, RNU62, és SNORD43 [72]. A változó expressziót mutató miRNS-ek kísérletes vizsgálatának első lépéseként egy olyan referencia miRNS kiválasztása szükséges, amely ideális esetben a legkisebb szórással rendelkezik a vizsgált betegcsoportok között. A normalizálás után a feldolgozási eljárásokból fakadó mérési hibák eliminálhatóak, így a valós biológiai eltérésekből fakadó különbségek detektálhatóvá válnak [73].

2.3.4. A mikroRNS-ek szerepe a daganatos megbetegedésekben

A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a miRNS-ek kóros kifejeződése számos rákos megbetegedésre jellemző; valamint szerepük lehet többek között a tumorok

kialakulásában és progressziójában is. A miRNS-ek viselkedhetnek onkogénekként (onkomiR) vagy tumorszuppresszorokként, így befolyásolhatják a daganatfejlődésben szerepet játszó gének expresszióját [74]. Az onkomiR-ek, a tumorszuppresszor gének gátlásával és/vagy a sejt differenciációban, apoptózis szabályozásában részt vevő gének inaktiválásával szabályoznak. Ezzel ellentétben tumorszuppresszornak tekinthetjük azokat a miRNS-eket, amelyek alacsony expresszióval detektálhatóak a tumoros mintában, így a sejt differenciációban és apoptózisban résztvevő gének felülszabályozása megszűnik és a sejtproliferáció felerősödik (2. táblázat) [75].

2.táblázat. OnkomiR és tumorszuppresszor miRNS-ek szerepe a vastagbélrákban

miRNS	validált target	funkciója CRC-ben	referencia
onkomiR-ek (daganatban felülexpresszáltak)			
miR-21	PTEN, PCDC4, TGFBR2, CDC25A	sejtproliferáció, apoptózis, sejtinvázió, migráció, daganatspecifikus őssejtek (CSC) fenntartása	[76-78]
miR-29a	KLF4	sejtinvázió, áttétképződés	[79]
miR-31	HIF1A, RhoBTB1, RASA1	sejtproliferáció, sejt migráció, sejtinvázió, tumornövekedés	[80-82]
miR-92a	PTEN	sejtproliferáció, sejt migráció, sejtinvázió, apoptózis, EMT	[83]
miR-96	TP53INP1, FOXO1, FOXO3A	sejtproliferáció	[84]
miR-135a/b	APC	sejtproliferáció	[85]
miR-155	MLH1, MSH2, MSH6	DNS törésre adott válaszreakció megváltozása	[86]
tumorszuppresszor miRNS-ek (daganatban alulexpresszáltak)			
let-7	KRAS	sejtproliferáció	[87]
miR-143	ERK5, KRAS, IGF1R	sejtproliferáció	[88,89]
miR-145	RS1, NRAS, IGF1R	sejtproliferáció, sejt migráció, sejtinvázió, angiogenezis, tumornövekedés, áttétképződés	[89,90]
miR-133a	FSCN1, LASP1	sejtproliferáció, sejt migráció, sejtinvázió, tumornövekedés, metasztázis, ERK/MEK foszforilálása	[91]

A daganatokban magas koncentrációban jelenlévő miRNS-ek hátterében a promóter régió transzkripció faktorainak amplifikációja, kóros szabályozása vagy a CpG-

szigetek DNS metilációs szintjének változása állhat. Az alacsony expressziós szintet deléciók, epigenetikus csendesítések, transzkripciós faktorok hiánya vagy egyéb nem kódoló RNS-ekkel történő interakciók okozhatják [92]. A miRNS mintázat megváltozásának hátterében a kromoszómális átrendeződés következtében kialakuló DNS-kópiaszám megváltozása is állhat. Zhang és mtsai. microarray-alapú, összehasonlító genomikus hibridizációs (CGH-comparative genomic hybridisation) módszerrel petefészek-, emlőkarcinómában valamint melanómában vizsgálták, hogy a miRNS lókuszok DNS-kópiaszám változásai hogyan feleltethetők meg az általuk mért érett miRNS mennyiségeknek. Megállapították, hogy azokban a DNS-szakaszokban, amelyekben kópiaszám változás történt, szintén érintettek voltak a miRNS géneket is magában foglaló régiók. Igazolták tehát a kópiaszám változás és miRNS expresszió közötti kapcsolatot [93].

Az első nem kódoló RNS felfedezését követően, az első humán eredetű miRNS-t is azonosították (3. táblázat). A let-7 család tagjairól később kiderült, hogy jelentősen csökken expressziós szintjük a különböző daganatos megbetegedésekben (tüdő-, vastagbél-, gyomor- és petefészekrák). Tüdődaganatos betegeknél, alulműködésének hatására szignifikánsan rövidebb túlélési időt figyeltek meg, sőt *in vitro* kísérletekben a tüdőrákos sejtek kolóniaképző képessége fokozódott is. A tapasztalásokat magyarázhatja az az eredmény, hogy evolúciósan konzerválódott és már jól körülírt let-7 miRNS egyik célpontja a RAS onkogén (2-3. táblázat) [94].

Az első tanulmány, amely a tumoros mintákban megváltozott miRNS kifejeződési mintázatról számolt be, a miR-15 és miR-16 gyakori delécióját és csökkent kifejeződését mutatta ki krónikus limfoid leukémiában (CLL) [95]. Egy évre rá megjelent az első publikáció, amely már a vastagbélrákos minták miRNS kifejeződésbeli változásairól számolt be. A szerzők huszonnyolc különböző miRNS szekvenciát azonosítottak adenokarcinómában, amelyek közül a miR-143 és a miR-145 csökkent expressziós mintázatot mutatott ép hám mintákhoz viszonyítva (3. táblázat) [96]. A miR-145 további vizsgálatakor biomarker funkciója is előtérbe került [97].

Egyre több kutatás számol be arról, hogy a miRNS-ek képesek befolyásolni a szabályozó útvonalak működését. A β -catenin/Wnt útvonalban (miR-135a/b, miR-139, miR-145, miR-17-19), a sejtosztódásban (let-7 család, miR-18a, miR-21, miR-126), az apoptózisban (miR-34a, miR-133b, miR-195), a sejtciklus szabályozásban (miR-34a,

miR-192, miR-215, miR-675), a p53-jelátvitelben (miR-34b/c), a differenciációban (miR-141, miR-200c) és a migráció-invázióban (miR-126, miR-143, miR-196a, miR-200a/b/c) is bizonyították szerepüket (2. táblázat) [98]. Gu és mtsai. párosított vastagbélrákos és ép szövetből végzett vizsgálat során kimutatták, hogy a miR-139 gátolja a sejtosztódást, a sejtciklus G1/S gátlásával. Tumorszuppresszor funkciója alátámasztható a rák előrehaladtával csökkenő expressziójával [99].

3.táblázat. A miRNS felfedezésének és daganatokban betöltött szerepük megismerésének legfontosabb állomásai.

Év	Mérföldkövek
1993	az első nem-kódoló RNS azonosítása: lin-4 <i>C. elegans</i> féregben [100]
2000	első humán miRNS, a let-7 felfedezése [101]
2001	a miRNS kifejezés első bevezetése a szakirodalomban [102]
2002	a rák és a miRNS kapcsolatát először tárgyalják krónikus limfoid leukémiában [103]
2003	a kolorektális adenokarcinóma szövetekben eltérő expressziót mutató miRNS-ek publikálása [96]
2002- 2003	a miRBase (miRNS szekvencia) adatbázis létrehozása [104]
2004	a miRNS, mint molekuláris biomarker tüdőrákos betegek túlélésénél vizsgálva [105]
2005	feltárják a miRNS-ek pontos funkcióját a daganatos betegségekben [106]
2005	transzkripciós faktorok szabályozzák a miRNS-ek expresszióját [107]
2005- 2007	onkogén és tumorszuppresszor hálózatokban feltárják a miRNS-ek szerepét [108,109]
2007- 2009	a metasztázisokban betöltött szerepük szerint gátolhatják vagy serkenthetik az áttétek képződését [110]
2008	keringő miRNS biomarkerek publikálása [111]
2013	miRNS terápiás lehetőségek kialakulása [112]

2.3.5. A véráramban keringő extracelluláris miRNS-ek

A miRNS-ek – az mRNS-ekkel ellentétben – stabil szerkezetűek, ellenállóbbak az RNáz enzimekkel szemben, a hosszantartó tárolás és az extrém körülmények (pl. magas és alacsony pH, forralás) során is megőrzik intaktságukat [113]. Jelentős mennyiségű daganat-specifikus miRNS detektálható teljes vérből, szérumból, plazmából valamint egyéb testfolyadékokból is [114]. Jelenlegi hipotézisek szerint a keringő miRNS-ek szöveti károsodás során, passzív módon kerülnek ki a véráramba. Ezt támasztja alá a kizárólag a szívben expresszálandó miR-208 példája is, amely szöveti sérülés esetén már plazmából is kimutatható. Ugyanilyen nem-specifikus kiáramlás figyelhető meg a daganatoknál is, mivel a magasfokú proliferáció és a sejtek nekrozisa egyaránt hozzájárul a plazmában detektálható miRNS-ek mennyiségéhez [115]. A keringő miRNS-ek stabil komplexekbe, exoszómákba vagy mikrovezikulákba csomagolódva szállítódnak, így az RNáz enzimek okozta degradációval szemben védettek [116]. Ezek olyan 50-100 nm nagyságú részecskék, amelyek a plazmamembránról fűződnek le és kerülnek ki az extracelluláris térbe, majd jelennek meg a véráramban. A mikrovezikulák különböző sejtípusokból származhatnak (pl.: retikulociták, dendritikus sejtek, B-/T-sejtek, hízósejtek) [117]. Egy másik módját is leírták, a miRNS-ek szállításának. Az argonauta- (Ago1, Ago2) és riboszómális fehérjékhez valamint az ún. nukleofoszminokhoz (NPM1) kötődve is stabilan szállítható az RNáz enzimekben gazdag extracelluláris térben [118].

A szakirodalom alapján napjainkban egyre több miRNS-t azonosítanak a különböző testfolyadékokban, ami a vastagbélrák diagnosztizálásában is egyre fontosabb szerepet kap [119]. A plazmából vagy szérumból származó miRNS-ek egyfajta perifériás vér biopsziaként („liquid biopsy”) szolgálva, hasznosak lehetnek a diagnosztikai területeken is [120]. Ng és mtsai. mutatták ki először, hogy a vizsgált miRNS-ek közül a miR-17-3p és a miR-92a szintje vastagbél-daganatos betegek plazmájában szignifikánsan megemelkedik az egészséges kontrollokhoz képest, a tumorszövet műtéti eltávolítása után pedig látványosan csökken az említett két miRNS szintje a vérben. Továbbá a miR-92a jelenlétével el lehet különíteni a vastagbélrákos mintákat más állapotoktól, mint például a gyomorráktól és a gyulladós bélbetegségektől (IBD-Inflammatory bowel disease) [121]. A miR-92a diagnosztikai értékét még jobban alátámasztja Huang és mtsai. megfigyelése, akik szerint a miR-92a segítségével megkülönböztethetőek a vastagbélrákos és high-grade adenómás minták a kontroll csoportoktól. A miR-92a

hasznos biomarkerré válhat a vastagbélrák korai diagnosztizálásában [122]. Hét szérumban eredetű exoszómális miRNS (let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223 és miR-23a) kifejeződése szignifikánsan magasabb szintet mutatott primer vastagbél tumoros betegekben és már korai stádiumban is az egészséges kontrollokhoz képest. Továbbá leírták, hogy a daganat sebészeti eltávolítása után szignifikánsan csökken a plazmában mért szintjük [123]. CRC-s betegekben a miR-27b, miR-148a és a miR-326 magas expressziója összefüggést mutatott a daganat kiújulásával [124].

A véráramban keringő miRNS-ek alkalmazásával kiküszöbölhetővé válnának a daganatos szövetekből történő direkt mintavételezések és a betegség lefutása során megváltozó szabad, sejten kívüli nukleinsavak expressziós mintázata nyomon követhetővé válna. A különböző testnedvekben jelenlévő miRNS tartalom információt szolgáltat a kibocsátó vagy akár a fogadó sejt eredetéről, valamint annak heterogenitásáról és malignitási fokáról.

3. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám célja:

- a vastagbélrákban és a rák megelőző tubuláris és tubulovillózus vastagbél adenómákban megváltozó miRNS kifejeződési mintázat globális microarray vizsgálat segítségével történő meghatározása az ép vastagbél szövetekhez képest;
- a miRNS-mRNS kapcsolatok feltérképezése *in silico* predikciós vizsgálatokkal, majd az eredmények megerősítése expresszió analízissel ugyanazon betegek vastagbél szövetmintáiból;
- a miRNS indukálta mRNS degradáció feltételezett kapcsolatának elemzése egy kiválasztott fehérje immunhisztokémiai vizsgálatával;
- a vastagbél daganat kialakulása során a plazmában megváltozó miRNS mintázat azonosítása microarray módszerrel, majd az eredmények megerősítése valós-idejű PCR technikával;
- választ keresni arra a kérdésre, hogy a plazmában keringő miRNS-ek kifejeződési mintázata korrelál-e a szövetben mért miRNS eltéréseivel a betegcsoportok között;
- a kereskedelmi forgalomban elérhető miRNS és teljes RNS frakciót izoláló módszerek hatékonyságának összevetése FFPE vastagbél szövetmintákon alkalmazva a mennyiségi és minőségi jellemzők meghatározásával.

4. MÓDSZEREK

4.1. Klinikai mintagyűjtés és feldolgozás

A szöveti és plazma microarray vizsgálatokhoz rutin kolonoszkópiás mintavételezésekből 20 egészséges, 11 tubuláris és 9 tubulovillózus adenóma és 20 vastagbél karcinóma, friss fagyasztott vastagbél biopszia mintákat (kb. 3-5 mg) gyűjtöttünk. Párhuzamosan K3EDTA (Greiner Bio-One GmbH, Ausztria) csövekbe stabilizált perifériás vérmintákat is gyűjtöttünk (4. táblázat).

Az izoláló módszerek összevetéséhez formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) műtétilag eltávolított mintákat vizsgáltunk és a minták klinikai adatait összegyűjtöttük. A szöveti blokkokat úgy válogattuk össze, hogy az egy betegből származó vastagbélrákos (Dukes B CRC, n=3) és tumor melletti egészséges (NAT, n=3) mintablokkok kevesebb, mint 5 évesek legyenek. A betegek 18 éven felüliek voltak (átlag életkoruk $65,7 \pm 7,6$ év). A CRC blokkok tumortartalma $> 60\%$ volt, amit hematoxilin-eozin festett lemezek alapján állapítottunk meg. Minden egyes FFPE blokkból 12 metszetet (vastagság: $10 \mu\text{m}$; 3 metszet/cső) készítettünk (4. táblázat).

4. táblázat. Összefoglalás a mintákról, módszerekről és vizsgálatokról. Rövidítések: N- egészség; AD-adenóma; T- tubuláris; TV-tubulovillózus; CRC- vastagbélrák; NAT- tumor melletti ép szövet; FFPE- formalin-fixált, paraffinba-ágyazott. *jelölés: csoportonként összeöntött (poolozott) minták.

Minta típus	Vizsgálati módszer	N		AD		CRC		NAT	Összesen
				T	TV				
biopszia	miRNS microarray	20		11	9	20		-	60
biopszia	mRNS microarray	7		2	4	7		-	20
biopszia	miRNS RT-PCR panel	10*	10*	11*	9*	10*	10*	-	6
plazma	miRNS microarray	4		4	4	4		-	16
biopszia	immun-hisztokémia	15		15		10		-	40
plazma	miRNS RT-PCR panel	3		3	3	3		-	12
FFPE műtéti	izoláló módszerek összehasonlítása	-		-	-	3		3	6

4.1.1. Biopsziás és műtéti szövetminták

A mintavételt követően RNALater (Qiagen, Németország) stabilizáló folyadékba helyeztük a biopsziákat és felhasználásig -80°C -on tároltuk őket. A sebészileg eltávolított műtéti szövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

4.1.2. Plazmaminták

A perifériás vérmintákat a páciensek könyökvénájából 6 ml-es K3EDTA csövekbe gyűjtöttük. A vérmintákból plazma frakciót szeparáltunk 4 órán belül. Szobahőmérsékleten 12 percen keresztül 1350 rcf sebességgel ülepitettük a mintákat, majd a felülúszót új csőbe pipetázva megismételtük a folyamatot. A hemolizált mintákat kizártuk a kísérletekből. Felhasználásig a mintákat -20°C tároltuk.

4.1.3. FFPE minták

Az FFPE minták a rutin patológiában alkalmazott folyamatnak megfelelően 4%-os pufferolt formaldehidben lettek rögzítve. Egyik mintacsoport sem tartalmazott olyan betegekből származó mintákat amelyek kemo- és radioterápiás kezelés alatt álltak a gyűjtés előtt. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot kaptunk, a mintagyűjtéshez

szükséges etikai engedélyt (ETT-TUKEB 23971/2011) a Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság jóváhagyta. Minden blokkokból három (10 µm vastagságú) metszet került egy mikrocentrifuga csőbe. A deparaffinálás első lépéseként a metszeteket 1 ml xilénben kétszer 10 percig inkubáltuk, majd a felülűszót 10 percig 13000 rcf-en történő centrifugálást követően eltávolítottuk. A fenti folyamatot kétlépéses abszolút etanolos (1 ml) inkubálási és ülepítési fázisok követték. Ezt követően az alkohol teljes mértékű eltávolítása érdekében 55°C-on 15 percen keresztül szabad levegőn szárítást végeztünk. A szabad levegőn szárított deparaffinált minták RNS izolálását ezután végeztük el.

4.2. Vastagbélrák és adenóma szövetminták miRNS expressziós profiljának meghatározása

4.2.1. Mintagyűjtés

A kísérlet során 20 egészséges, 11 tubuláris, 9 tubulovillózus adenómás és 20 vastagbélrákos beteg biopsziás mintáit vizsgáltuk miRNS microarray módszerrel (5. táblázat).

5. **táblázat.** A kísérletben vizsgált minták részletes adatai. Rövidítések: AD-adenóma; CRC-vastagbélrák; N/A- nincs adat.

	egészséges (n=20)	adenóma (n=20)	CRC (n=20)
átlag életkor	51±17	64±10	63±14
nem arány, nő/férfi	16/4	10/10	8/12
AD/CRC lokalizáció (db)			
szigmabél		6	5
leszálló vastagbél		-	1
haránt vastagbél		1	2
felsőzálló vastagbél		3	1
vakbél		4	1
végbél		6	9
N/A			1
vastagbélrák TNM stádium, (db)			
I			1
II			7
III			9
IV			2
N/A			1
vastagbélrák Dukes stádium, (db)			
Dukes B			6
Dukes C			9
Dukes D			3
N/A			2
adenóma besorolása, (db)			
tubuláris		11	
tubulovillózus		9	

4.2.2. RNS izolálás

A biopsziás minták tömegének (20mg-30mg) lemérése után minden mintát egyenként MagNA Lyser Green Beads (Roche Applied Science, Svájc) kerámia gyöngyöket tartalmazó centrifuga csövekbe helyeztünk, majd 400 µl 20%-os kötő puffert (High Pure miRNA Isolation Kit, Roche Applied Science, Németország) adtunk hozzá. A homogenizálást 6500 rpm sebességgel 50 másodpercen keresztül, két körben végeztük a MagNA Lyser (Roche Applied Science) homogenizátor segítségével. A lizátumból 150 µl-t tiszta csőbe helyeztük majd teljes RNS frakciót vontunk ki a High Pure miRNS Izoláló kit (Roche Applied Science) segítségével. A mintákhoz 312 µl kötő puffert (Binding buffer) és 200 µl RNS megkötését elősegítő reagenst (Binding Enhancer)

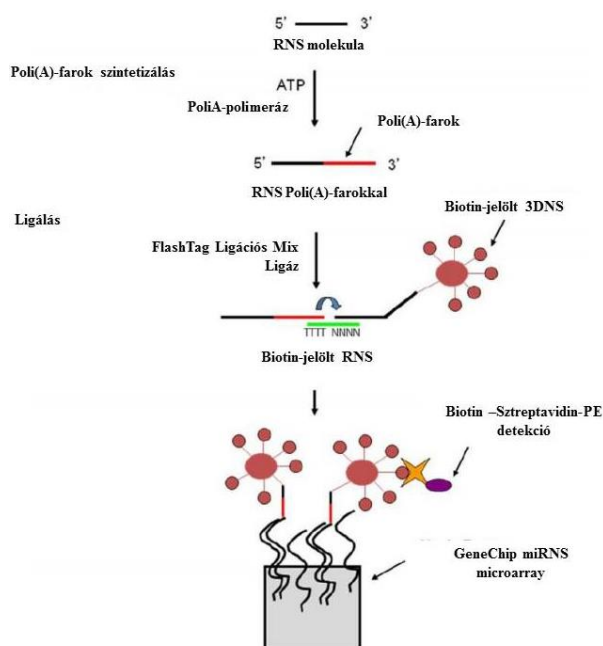
pipettáztunk, majd az elegyet alapos keverés után a kitben található izoláló oszlopra (High Pure Filter Tube) öntöttük. A mintákat 13000 rcf-en 30 másodpercen át centrifugáltuk. Ezt mosó lépések követték, először 500 µl majd 300 µl mosó pufferrel (Wash Buffer), amelyet mindkét esetben centrifugálás követett 13000 rcf fordulaton 30 másodpercen keresztül. Végül az oszlopot 1 percen keresztül szárítottuk 13000 rcf sebességgel centrifugálva. A miRNS frakciót 100 µl eluáló pufferrel (Elution Buffer) mostuk le egy új tiszta csőbe. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.2.3. A kinyert RNS minőségi és mennyiségi vizsgálata

Az RNS minták koncentrációját Qubit High Sensitivity RNA Assay kitet alkalmazva a Qubit 1.0 fluoriméter (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével mértük le a gyártó utasításai alapján. A fluorimetriás módszer alapja, hogy a mintába juttatott fluoreszcens festék csak akkor emittál, ha a megfelelő cél nukleinsav-szálak közé beköt. Az RNS intaktságát 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, USA) készülékkel az Agilent RNA Pico 6000 kit reagensei segítségével vizsgáltuk. Az input RNS mennyiségét standardizáltuk, 5 ng RNS/mintát használtunk fel a mérés során. Az elektroferogram 25 és 6000 nukleotid hosszúság közötti szakaszokat képes kirajzolni, így a miRNS-ek várható tartománya (22-25 nukleotid) nagy érzékenységgel detektálható a módszerrel.

4.2.4. miRNS expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával

A miRNS expressziós profilt GeneChip miRNA 3.0 array (Affymetrix) módszerrel vizsgáltuk. A miRNS-t is tartalmazó szöveti RNS-ből 1 µg-ot biotin molekulákkal jelöltünk a FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kittel (Affymetrix, USA). Első lépésben a mintákhoz belső kontroll oligonukleotidokat (Spike Control Oligo) kevertünk, majd az RNS molekulákhoz poli(A)-farkat szintetizáltunk. A reakció 1,5 µl reakciópuffer (10x), 1,5 µl MnCl₂ (25nM), 1 µl ATP mix és Poli(A)-polimeráz enzim elegyével 37°C-on 15 percen keresztül az Eppendorf Mastercycler ep Gradient S PCR (Eppendorf, Németország) készülékben szintetizálódott. Következő lépésben a ligálás során a mintákhoz 4 µl FlashTag Biotin HSR ligációs Mixet és 2 µl T4 DNS ligáz enzimet pipettáztunk, majd a reakcióelegyet PCR készülékben 25°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk (9. ábra).



9. ábra. Az RNS biotin molekulával történő jelölése (forrás: <https://www.thermofisher.com> nyomán)

A chipet 15 perccel felhasználás előtt szobahőmérsékletre helyeztük (és beregisztráltuk a GeneChip Command Console [Affymetrix, USA] szoftverbe). Ezt követően a chipet 130 µl prehibridizációs pufferrel töltöttük fel és 30 percen keresztül 48°C-on folyamatos forgatás (60 rpm) mellett a GeneChip Hybridization Oven 645 (Affymetrix) gépben inkubáltuk. Mindeközben elkészítettük a hibridizációs koktélt, ami a hibridizációs mixen (2x) kívül tartalmazta a hibridizáció belső kontrolljaként használt eukarióta hibridizációs kontrollokat (bioB, bioC, bioD, cre), 4%-os formamidot és 9,7%-os DMSO-t. A ligált mintákat és a hibridizációs koktélt összeöntöttük és 99°C-on, majd 45°C-on 5-5 percig inkubáltuk, végül a chip kamrájába töltöttük őket. Az előkészített mintákat 16 órán keresztül 48°C-on folyamatos forgatás (60 rpm) mellett a hibridizációs kamrában inkubáltuk. A chipet a GeneChip Fluidics Station 450 berendezésen (Affymetrix) az FS450_0002 előre beprogramozott, gyártó által ajánlott mosási protokollal mostuk és antitest amplifikációs festési módszerrel festettük. A chipet a GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) műszerrel szkenneltük.

4.2.5. mRNS expressziós vizsgálat Human Transcriptome Array 2.0 rendszeren

A 20 vastagbél biopsziából izolált RNS mintából (7 normál, 2 tubuláris, 4 tubulovillózus adenóma és 7 tumor) mRNS expressziós microarray vizsgálatot végeztünk. Az egyszálú cDNS szintézist 100 ng kiindulási anyagmennyiségből

végeztük. Következő lépésben duplaszálú cDNS-t szintetizáltunk, amelyet cRNS-sé konvertáltunk majd amplifikáltunk. Összesen 15 µg cRNS-ből újra duplaszálú cDNS-t szintetizáltunk, amelyet fragmentáltunk és jelöltünk. A mintákat GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 chipekre (Affymetrix) vittük fel, majd 16 órán keresztül 45°C-on 60 rpm fordulaton hibridizációs kamrában inkubáltunk. Ezt követően a chipeket a hibridizációs mosó és jelölőreagensekkel az előre programozott protokollal (FS450_0001) a Fluidics Station 450 berendezéssel (Affymetrix) jelöltük. A chipek szkennelését a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) műszerrel végeztük.

4.2.6. A microarray vizsgálatok statisztikai elemzése

A microarray vizsgálatokból származó nyers probe cell értékeket az Expression Console Szoftverrel (Affymetrix) értékeltük. A nyers eredményeket robust multichip averaging (RMA) algoritmussal korrigáltuk, amelyekből megkaptuk a “próba intenzitás” értékeket. A GeneChip miRNA 3.0 array 1733 érett miRNS-re specifikus oligonukleotidot tartalmaz. A betegcsoportok közötti összehasonlításnál az alábbi szignifikancia értékeket határoztuk meg: $p < 0,05$ és $\log FC > |1|$.

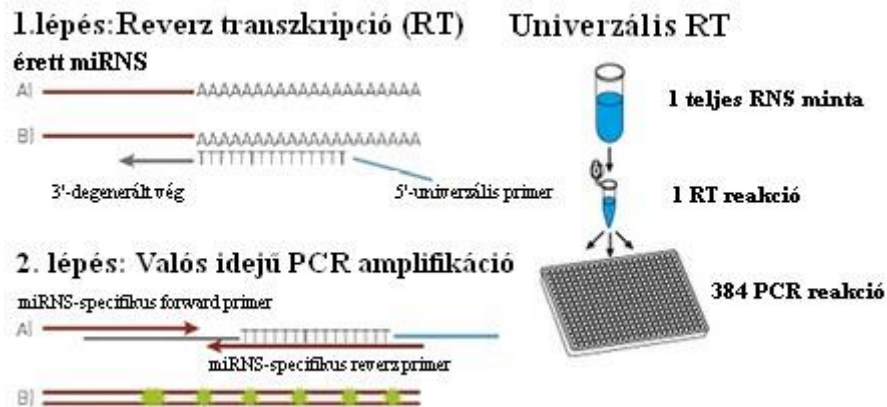
4.2.7. A biopsziamintákon vizsgált valós-idejű kvantitatív PCR analízise

A biopsziamintákból izolált RNS molekulákat betegcsoportonként összeöntöttük a 4. táblázatban vázoltak szerint. A mintákat 5 ng/µl koncentrációra hígítottuk, majd 3 µl-t pipettáztunk össze betegcsoportonként. Az egészséges és tumoros csoportban 10-10, amíg a tubuláris és tubulovillózus esetén 11-9 mintafelosztást alakítottunk ki.

A miRCURY™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Dánia) protokoll két-lépcsős folyamat (10. ábra). Első lépésben egyszálú cDNS szintézis valósul meg, amelyet valós-idejű PCR felszaporítás követ. A reverz transzkripció reakcióban 40 ng izolált RNS mintát használtunk fel és az alábbi módszer szerint jártunk el. Poli(A)-farkat szintetizáltunk a miRNS molekulákhoz, amelyet cDNS szintézis követett. A mintánkénti reakcióelegyek (40 µl) az alábbi reagenseket tartalmazták: 8 µl reakciópuffer (5x), 20 µl nukleáz-mentes víz, 4 µl enzim mix és 8 µl RNS minta (5 ng/µl). A reakció 42°C-on 60 percig, majd 95°C-on 5 percig zajlott Mastercycler EP Gradient S PCR (Eppendorf, USA) készülékben.

Ezután a cDNS templátot miRNS-specifikus LNA-módosított forward és reverz primerekkel SYBRGreen jelöléssel felszaporítottunk a gyárilag tervezett Ready-to-use

microRNA PCR Human Panels I + II V2. R (Exiqon) paneleken. A paneleket használat előtt 1500 rcf sebességgel centrifugáltuk, majd összemértük a 768 (2x384) reakcióterben zajló PCR reakciókhoz szükséges reagenseket. A 4000 µl PCR Master mixet (2x) 3960 µl nukleáz-mentes vízzel hígítottuk, majd hozzáadtuk az előző reakcióban átírt 40 µl cDNS-t. A wellenkénti mintamennyiséget (10 µl) elosztottuk a két plate között.



10. ábra. A miRCURY™ Universal RT microRNA PCR működési elve (forrás: www.exiqon.com)

A qPCR reakciókat az LC480 (Roche Applied Science) valós-idejű PCR gép használatával végeztük el az Exiqon cég által javasolt hőciklusokat alkalmazva: denaturálás 95°C 10 perc, 45 amplifikációs ciklus 95°C 10s 60°C 1 perc. Az amplifikációs görbéket a LightCycler 480 Szoftverrel (Life Science Roche, USA) értékeltük. Az általunk használt dupla 384-es panel összesen 768 reakcióteret tartalmazott, amelyekben 742 miRNS expressziós profilját analizáltuk. Ezen felül minden lemez tartalmazott interplate kalibrátorokat hármas ismétlésben, amellyel kiküszöbölhetővé váltak a technikai eltérések és a reakciókat normalizálhattuk.

A friss fagyasztott biopsziaminták esetén a hsa-miR-423-5p-t használtuk normalizáláshoz. A miRNS-ek expressziós szintjének relatív kvantifikációját a $\Delta\Delta C_p$ -módszerrel határoztuk meg: $\Delta C_p = (C_{p_{miRNS}} - C_{p_{miR-423-5p}})$; $\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{vizsgált\ betegcsoport}} - \Delta C_{p_{kontroll\ csoport}}$.

4.2.8. *In silico* miRNA-mRNS target predikció

Annak érdekében, hogy a különböző betegcsoportokban megváltozott expressziót mutató miRNS-ek további funkcióját is megvizsgáljuk, három miRNS-t választottunk ki: miRNS microarray vizsgálataink eredménye alapján a miR-31 rendelkezett a legmagasabb intenzitás értékekkel egészséges és adenóma, egészséges és CRC páros összehasonlításokban; a miR-4417 és a miR-497 pedig olyan miRNS-ek, amelyek az adenóma-karcinóma átmenet során fokozatos felül- vagy alulexpressziót mutattak. A kiválasztott miRNS-ek mRNS targetjeit 5 eltérő target predikciós algoritmussal (TargetScan, miRanda, PICTAR2, RNAHybrid, miRWalk a miRWalk 2.0 adatbázisban) határoztuk meg. A DAVID rendszert (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) felhasználva útvonal analízist végeztünk.

4.2.9. A ciklin D1 immunhisztokémiai vizsgálata

A ciklin D1 immunhisztokémiai vizsgálatát egészséges (n=15), valamint adenóma (n=15) és CRC (n=10) diagnózissal rendelkező páciensekből származó FFPE metszeteken végeztük el. A deparaffinálást és a leszálló alkoholsoros rehidratációt követően mikrohullámú antigénfeltárást végeztünk TRIS EDTA pufferrel (pH 9.0; 900 W/10 perc, majd 340 W/40 perc). Ezután a mintákat ciklin D1 elleni monoklonális antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten egy órán keresztül (klón: SP4: Histopathology Kft, Magyarország, 1:100 hígítás) ezt követően diaminobenzidin-hidrogén preoxidáz-kromogén szubsztráttal tettük láthatóvá (HISTOLS-DAB, Histopathology Kft). A metszeteket Panoramic 250 Flash II berendezéssel (3DHISTECH Kft., Magyarország) archiváltuk, majd Panoramic Viewer (ver.:1.15.3; 3DHISTECH Kft.) digitális mikroszkóppal vizsgáltuk. A kiértékelés szemikvantitatív módon, Q-score módszerrel történt: a pozitív sejtek arányát (P; maximum 100%) megszorozzuk a hozzájuk tartozó intenzitás értékkel (I: +3, +2, +1, 0; Formula: $Q=P \times I$; a Q maximuma 300). Elsődlegesen külön vizsgáltuk a hám, illetve hám eredetű karcinóma sejteket (epitéliális; EP) valamint a strómális (ST) komponenseket, majd összeadtuk a kapott értékeket ($\Sigma Q=Q_{EP}+Q_{ST}$), így a fehérje kifejeződés változása összevethetővé vált a biopsziákban mért korábbi miRNS és mRNS expressziós eredményeinkkel.

4.3. miRNS-profil vizsgálat párosított plazmamintákon

4.3.1. miRNS izolálás plazmamintákból

A miRNS frakciót QIAamp Circulating Nucleic Acid Kittel (Qiagen, Németország) vontuk ki, a plazmamintákból az alábbi módosított protokoll szerint: 1ml plazmát 100 µl proteináz K (Qiagen) és 800 µl ACL pufferrel (Qiagen) vegyítettük és 60°C-on 30 percig inkubáltuk. Ezt követően 1800 µl ACB puffert (Qiagen) és 3 ml izopropanolt adagoltunk a mixhez, majd a csöveket óvatos forgatással összekevertünk. Egy teljes éjszakán át -20°C-on inkubáltuk a mintákat, majd a mixet a QIAamp Mini oszlopon a QIAvac 24 Plus (Qiagen) vákuumszivattyú segítségével engedték át. Ezt követően az oszlopot 1ml 70%-os és 1ml abszolút etanollal mostuk, végül 20000 rcf sebességen történő centrifugálás után az eluálást 30 µl AVE pufferrel (Qiagen) végeztük. A minták koncentrációját Qubit 1.0 fluoriméterrel (Thermo Fisher Scientific, USA) határoztuk meg az RNA High Sensitivity Assay Kit segítségével.

4.3.2. miRNS expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával

A 4. táblázatban feltüntetett mintafelosztásban a plazmaminták esetén 100 ng teljes RNS kiindulási mennyiséget használtunk fel a chipekre. A vizsgálatot a 4.2.3. pontban részletezett módon végeztük.

4.3.3. A microarray vizsgálatok statisztikai elemzése

A microarray vizsgálatokból származó nyers probe cell értékeket az Expression Console Szoftverrel (Affymetrix) értékeltük a 4.2.10. pontban részletezett módon. A betegcsoportok közötti összehasonlításnál az alábbi szignifikancia értékeket határoztuk meg: $p < 0,05$ és $\log_{2}FC > |0,5|$.

4.3.4. Valós-idejű kvantitatív PCR analízis

A PCR vizsgálatokat a miRCURY™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Dánia) módszerrel végeztük a 4.2.6. alfejezetben tárgyaltak szerint. A plazmaminták esetén a SNORD49A miRNS-t használtuk normalizáláshoz.

4.4. miRNS és teljes RNS frakciót izoláló módszerek hatékonyságának összehasonlító vizsgálata FFPE szövetmintákon

4.4.1. Mintagyűjtés

A 3 CRC és párosított 3 NAT FFPE szövetminta gyűjtése a 4.1.2. fejezetben leírtak szerint történt. A vizsgálatba bevont szövetminták adatait az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. A kísérlet során felhasznált minták jellemzői. Rövidítések: NAT- tumor melletti ép szövet; CRC- vastagbélrák.

	NAT-CRC párok (Dukes B)
esetszám (fő)	3
nem arány (nő/férfi)	2/1
átlag életkor (év)	67,6±7,6

4.4.2. RNS kinyerése miRCURY™ RNA - Tissue Izoláló Kit felhasználásával

A deparaffinált mintákból RNS mintát a miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon, Dánia) szövetből izoláló módszerével nyertük ki. A gyártó leírása szerint a teljes RNS frakcióval együtt izolálható a miRNS frakció is. A szövetmintákat lízis pufferbe (300 µl) helyeztük és 600 µl RNáz-mentes vízzel kiegészítettük. Ezután proteináz K enzimmal (20 µl) történő emésztést 55°C-on 15 percen keresztül végeztünk. A felülúszót 96%-os etanollal (450 µl) kicsapva a mintákat az izoláló oszlopra vittük, amelyet 14000 rcf-en centrifugáltunk. Ezt követően az oszlopot mosó pufferrel (Exiqon) tisztítottuk. Ezt követte az oszlopon történő DNáz emésztés. Az enzimet és az inkubációs puffert a High Pure RNA Paraffin izoláló kitben (Roche, Németország) található reagensekkel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A mintákhoz 95 µL inkubációs puffert (1x) + 5 µL DNáz I enzimet adtunk, majd a DNáz elegyet 25°C-on 15 percig inkubáltuk az oszlopon. Az emésztést kétszeres mosási lépés követett 400 µl kitben található mosó puffert használva. Végül a tisztított RNS-t egy új gyűjtőcsőben 50 µl eluáló pufferrel (Exiqon) oldottuk le. A mintákat további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.4.3. RNS kinyerése High Pure miRNA Izoláló Kit felhasználásával

A High Pure miRNA Isolation Kit (Roche) miRNS frakció kinyerésére fejlesztett módszer. A dúsított miRNS frakciót kétoszlopos eljárással és a formalin-fixált paraffinba ágyazott szöveti mintákra optimalizált módszerrel kaptuk meg. A szövetek emésztését a kitben található lízis pufferben (100 µl), 10 µl 10%-os nátrium dodecil szulfáttal (SDS) és 40 µl proteináz K enzim hozzáadásával egy teljes éjszakán át 55°C-on végeztük. Ezután az RNS oszlophoz kötődés hatékonyságának növelésére kötő puffereket (Bindig buffer, Roche) adtunk a lizátumhoz, majd lecentrifugáltuk az oszlopot. Ezt követően az átfolyó tartalmat összegyűjtöttük egy tiszta csőbe és egy újabb izoláló oszlopon átfolyatva újracentrifugáltuk. A 2. oszlop által megkötött RNS frakció már csak a kis RNS szekvenciákat tartalmazta. Ezután mosási lépések következtek kétszer ismételve 700 µl mosó pufferrel (Roche). Az RNS-t 100 µl eluáló pufferrel tisztítottuk. A DNáz kezelést PCR tisztaságú víz (49,5 µl) inkubációs puffer (19,5 µl) és 2 µl DNáz I (5 U/µL) reagensek hozzáadásával végeztük 30 percig 37°C-on. A már DNS-mentes eluátumot egy újabb oszlopon átengedve a fentebb részletezett mosási lépések után újra eluáltuk egy új csőbe 50 µl végtérfogatban. A mintákat további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.4.4. RNS izolálása High Pure RNA Paraffin Kit felhasználásával

A deparaffinálást követően az emésztést szintén 10%-os SDS, proteináz K és lízis puffer keverékével végeztük 85°C-on 30 percen keresztül, amely lépést újabb proteináz K emésztés követett további 30 perc inkubálással 55°C-on. Paraffin-kötő puffer (Roche) és abszolút etanol hozzáadásával vortexelést követően lecentrifugáltuk a csövek tartalmát az oszlopon. Az átfolyót kiöntve oszlopon történő DNáz kezelést végeztünk. 90 µl DNáz inkubációs pufferrel (1x) és 10 µl Dnáz I enzimmel (5 U/µl) kezeltük a mintákat 15 percen keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően kétféle mosó pufferrel (Roche) összesen háromszor mostuk az oszlopokat. Az oszlopok magas fordulatszámon (20000 ref) történő szárítását követően 50 µl végtérfogatban eluáltuk a mintákat, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.4.5. RNS izolálása MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit felhasználásával

A kézi izolálási módszer mellett az RNS kinyerést párhuzamosan egy nukleinsav izoláló automatával is elvégeztük. A deparaffinált mintákból történő RNS izolálást a MagNA Pure 96 (Roche, Németország) izoláló automatán végeztük: a mintákhoz 110 µl MagNA Pure DNA szövet lízis puffert (Roche) és 50 µl proteináz K reagenseket adtunk, majd alapos vortexelést követően a mintákat 55°C-on egy teljes éjszakán át emésztettük. 150 µl-t áthelyezve az automata feldolgozó tálcájába (processing cartridge) az RNA FFPET LV 0.21 protokollt kiválasztva elindítottuk az izolálást. Az eluátumot a felhasználásig - 80°C-on tároltuk.

4.4.6. A kinyert RNS minőségi és mennyiségi vizsgálata

Az RNS minták koncentrációját Qubit High Sensitivity RNA Assay kitet alkalmazva a Qubit 1.0 fluoriméter (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük le a gyártó utasításai alapján. Az RNS intaktságát 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, USA) készülékkel az Agilent RNA Pico 6000 kit reagensei segítségével vizsgáltuk a 4.2.3. pontban leírt részletek alapján.

4.4.7. Valós idejű kvantitatív PCR analízis

A különböző eljárásokkal izolált miRNS-ek expresszióját a kétlépéses miRCURY™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon) módszerrel végeztük. Az RNS mintákból minden esetben 40 ng kiindulási mennyiségből szintetizáltunk cDNS mintát. A folyamatot a 4.2.6. alfejezet alatt részletezett módon végeztük el.

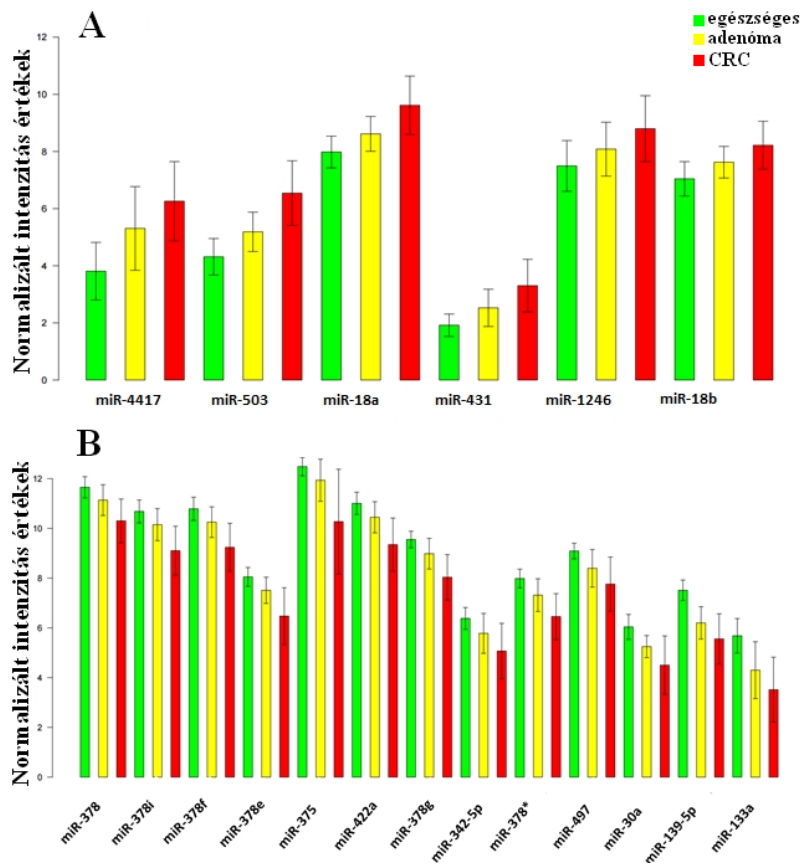
4.4.8. A referencia miRNS kiválasztása

Előzetes ismereteink szerint az irodalomban használt különböző referencia miRNS-ek nagymértékben befolyásolják a vizsgált miRNS-ek relatív kifejeződését. Ezért a tesztelt izoláló módszerek összevetésének vizsgálatát során több, a gyári Exiqon plate-en megtalálható referencia RNS-t is összehasonlítottunk: U6small nuclear RNA (U6), small nuclearRNA 49A (SNORD49A), small nuclear RNA (SNORD38), miRNA-490-3p (Hsa-miR-490-3p).

5. EREDMÉNYEK

5.1. A miRNS kifejeződés microarray-alapú vizsgálata vastagbél szövetmintákban

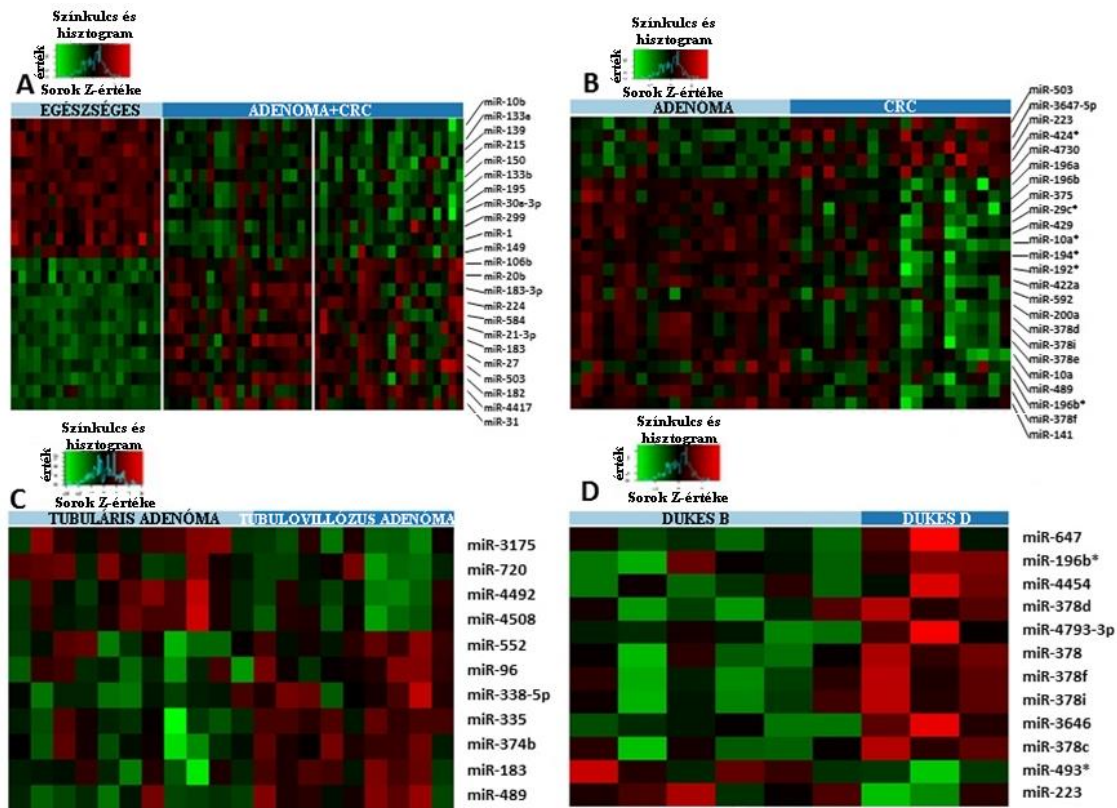
A miRNS microarray elemzést egészséges, adenómás (tubuláris és tubulovillózus) és CRC-s betegek biopsziás szövetmintáin végeztük. A microarray vizsgálatainkra alapozva a vastagbél adenóma-karcinóma átmenet során 19 miRNS-t választottunk ki, amelyek expressziója folyamatos emelkedést vagy csökkenést mutatott a betegség progressziójával párhuzamosan (11. ábra). A miR-4417 esetében 2,8-szoros expresszió növekedést mértünk adenómákban az egészséges mintákhoz viszonyítva, majd kifejeződése CRC mintákban közel kétszeresre (1,9-szeresére) fokozódott. A nyolc csökkent kifejeződésű miRNS (kivéve a miR-378 család) szintje 29-60%-kal csökkent adenómában az ép szövethez viszonyítva, majd kifejeződésük tovább csökkent (34-66,8%-kal) a vastagbélrákos mintákban.



11. ábra. A folyamatosan növekvő (A) és csökkenő (B) expressziót mutató miRNS-ek kifejeződése a vastagbélrák kifejlődése során szövetmintákban microarray eredmények alapján. A zöld szín az egészséges mintákat, a sárga az adenóma, a piros a CRC mintákat jelképezi ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$). Rövidítések: CRC-vastagbélrák.

A 12. ábra a microarray vizsgálatokból származó miRNS expressziós profilt mutatja hőterképeken ábrázolva. Az 12/A. ábra az egészséges mintákban kimutatható kifejeződést jeleníti meg a rákelőző állapotokhoz és a rosszindulatú elváltozásokhoz képest. Huszonhárom miRNS (ebből 11 csökkent, 12 fokozott expressziójú) kifejeződése egészséges vastagbélzövetekben szignifikáns eltérést mutatott a rákelőző adenóma és a tumoros mintákhoz viszonyítva. A 12 emelkedett szintű miRNS esetében minimum kétszeres expresszió növekedést mértünk az ép-adenóma-karcinóma szekvencia során. A legmagasabb expressziót a miR-31 esetében figyeltük meg, az ép

szövetekhez viszonyítva nyolcszoros emelkedést észleltünk mind adenóma, mind CRC mintákban.

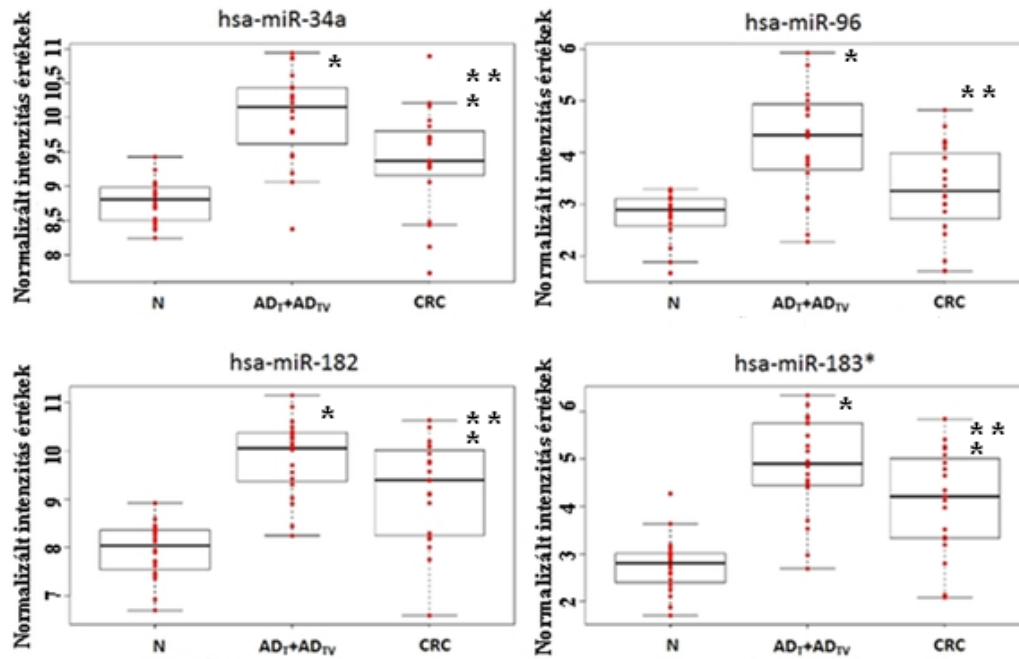


12. ábra. A: Az eltérő miRNS expressziós mintázat vizualizálása hőterképen az egészséges és a különböző betegcsoportok között. A zöld szín az alacsony expressziós intenzitást, míg a piros szín a magas expressziós értékeket jelképezi. Minden sor egy miRNS-t, minden oszlop egy mintát jelent ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$). B: A tubuláris, tubulovillózus adenóma és a vastagbélrákos minták közötti miRNS expressziós eltérések megjelenítése ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$). C: A két adenóma betegcsoport szöveti miRNS kifejeződés eltéréseit ábrázolja ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$). D: A korai és előrehaladott vastagbélrákos mintákban (a Dukes besorolás alapján) eltérő expresszióval jellemezhető miRNS-ek csoportjai ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$).

Az adenóma és vastagbélrákos mintákat összehasonlítva 24 miRNS felelt meg az általunk felállított szignifikancia kritériumoknak ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$), ezek közül összesen öt miRNS mutatott emelkedett expressziót CRC-ben (12/B ábra). Tizenegy olyan miRNS-t azonosítottunk, amelyek segítségével a tubuláris és a tubulovillózus adenómák elkülöníthetőek voltak. Tubulovillózus adenómában a legnagyobb, több mint

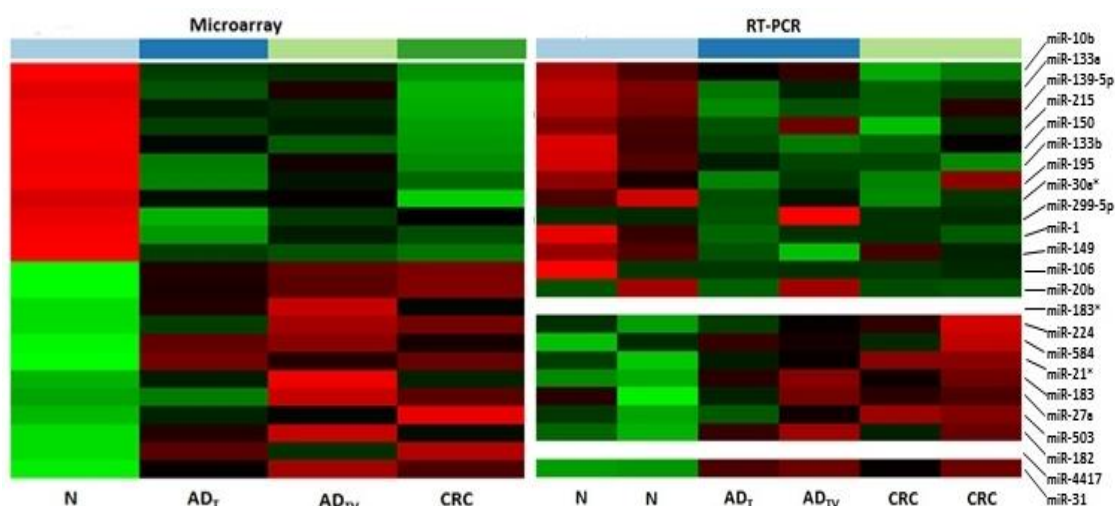
4,5-szeres expresszió növekedést a miR-489 esetén mértük a tubuláris adenómához képest (12/C ábra). A vastagbélrákos mintákat Dukes-stádium beosztás alapján is megvizsgáltuk, és 12 eltérően expresszáló miRNS-t azonosítottunk (12/D ábra). A miRNS-ek többsége fokozott kifejeződést mutatott előrehaladott, Dukes D stádiumú vastagbélrákban. Érdekes módon a miR-378 család tagjai magasán reprezentáltak ebben az összehasonlításban, hasonlóan, mint az adenóma - karcinóma progresszió során fokozatosan növekvő és csökkenő expressziós intenzitást mutató miRNS-ek csoportjában.

Az adenóma versus karcinóma összehasonlításban az eltérően expresszáló miRNS-ek nagyobb hányada az adenóma mintákban mutatott magasabb kifejeződést a CRC mintákhoz képest (12/B ábra). Ezért az adenóma-specifikus miRNS-ek csoportjára fókuszáltunk, és kiválasztottuk azokat, amelyek adenómában az egészséges mintákhoz képest magas expresszióval jellemezhetőek, de a kifejeződésük CRC mintákban szignifikánsan lecsökken. A 13. ábra négy olyan miRNS-t ábrázol, amelyek a legnagyobb kifejeződést mutatták az adenóma mintákban. A miR-182, a miR-183*, a miR-96 és a miR-34a expressziója 29%-kal csökkent a rákos mintákban az adenóma mintákhoz hasonlítva.



13. ábra. Az adenóma-specifikus miRNS-ek kifejeződése a szövetmintákban. Rövidítések: N-egészséges; AD_T- tubuláris adenóma; AD_{TV}- tubulovillózus adenóma; CRC- vastagbélrák. *Szigifikáns eltérés ($p < 0,05$): N vs. AD_T +AD_{TV}; N vs. CRC $p < 0,05$; ** Szigifikáns eltérés ($p < 0,05$): AD_T +AD_{TV} vs. CRC $p < 0,05$.

Azon miRNS-ek csoportján, amelyek kifejeződésének eltérését sikeresen kimutattuk microarray módszerrel a különböző betegcsoportok között, valós idejű PCR validációs vizsgálatokat végeztünk (14. ábra). Az RT-PCR eredmények alátámasztották a microarray elemzés megállapításainak jelentős részét, a miR-4417 és a miR-183* kivételével, amelyek nem voltak reprezentálva a PCR paneleken.

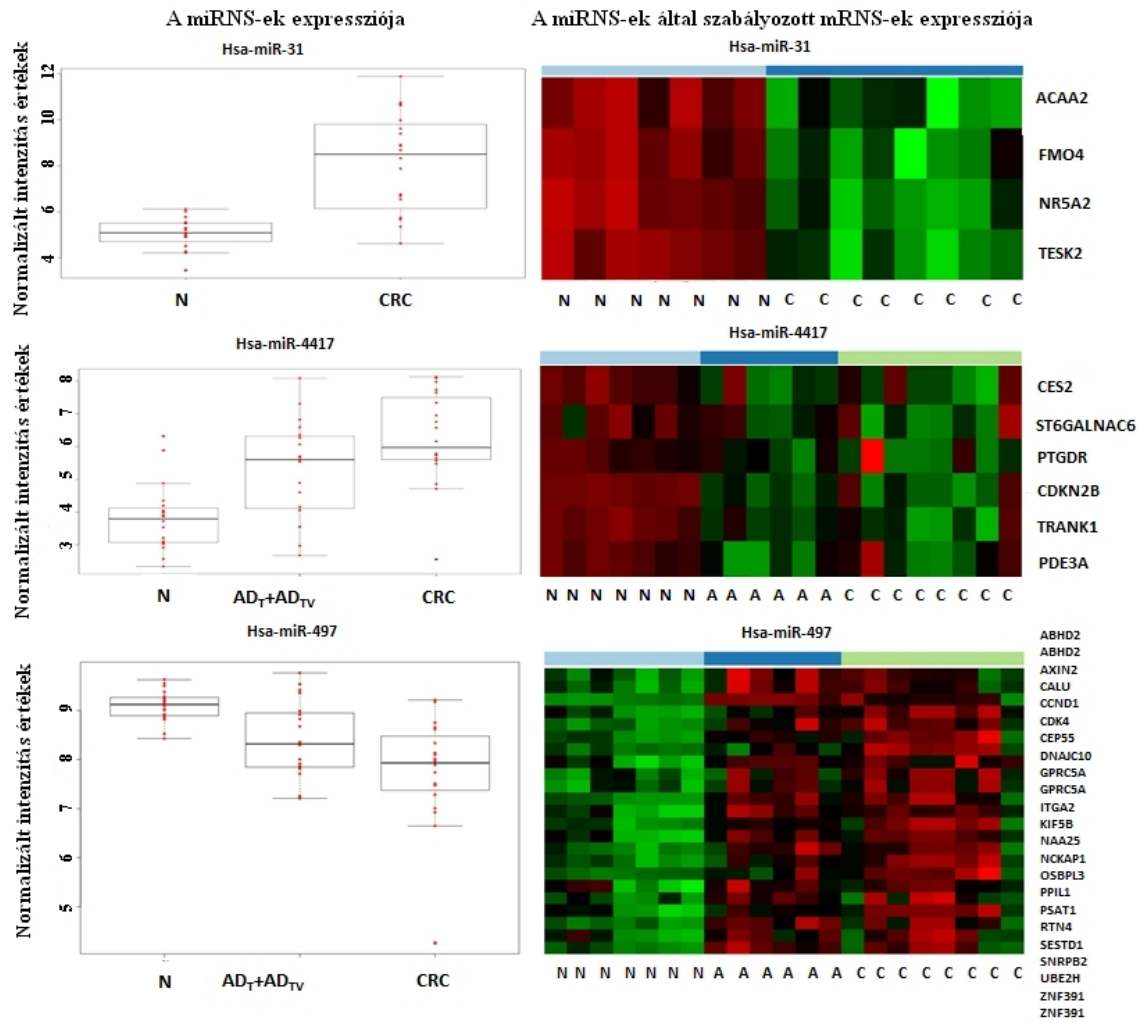


14. ábra. A neoplasztikus elváltozások során megváltozó miRNS expressziós eredmények megerősítése valós-idejű PCR módszerrel. A bal oldali hő térkép a microarray módszerrel kapott miRNS expressziós intenzitásokat, a jobb oldali pedig a valós-idejű PCR eredményeket ábrázolja megegyező mintafelosztásban. Rövidítések: N-egészséges; AD_T - tubuláris adenóma; AD_{IV}- tubulovillózus adenóma; CRC- vastagbélrák.

5.2. *In silico* célpont mRNS predikció és validáció Human Transcriptome Array 2.0 microarray rendszeren

Három miRNS-t vizsgáltunk: a páros összehasonlításban (normális - CRC) a miR-31 mutatta a legnagyobb expressziós intenzitás érték eltéréseket. Emellett két további miRNS-t (miR-4417 és miR-497) választottunk ki, amelyek kifejeződése folyamatosan növekedett vagy csökkent az ép - adenóma - karcinóma átmenet során. A fenti miRNS-ek mRNS célmolekuláit a miRWalk 2.0 felhasználói felületen határoztuk meg *in silico* elemzéssel.

A Human Transcriptome Array 2.0 microarray használatával párhuzamos vizsgálatokat folytattunk, amely segítségével több, mint 245,000 kódoló transzkriptum kifejeződését tudtuk tanulmányozni. A microarray eredmények alapján kiválasztottuk az alacsonyan expresszálódó mRNS-eket. A kiválasztott miRNS-ek célpontjai a 15. ábrán láthatóak. Az mRNS-ek kifejeződési mintázata ellentétes irányú volt a miRNS-ek esetében megfigyelt expresszióval.

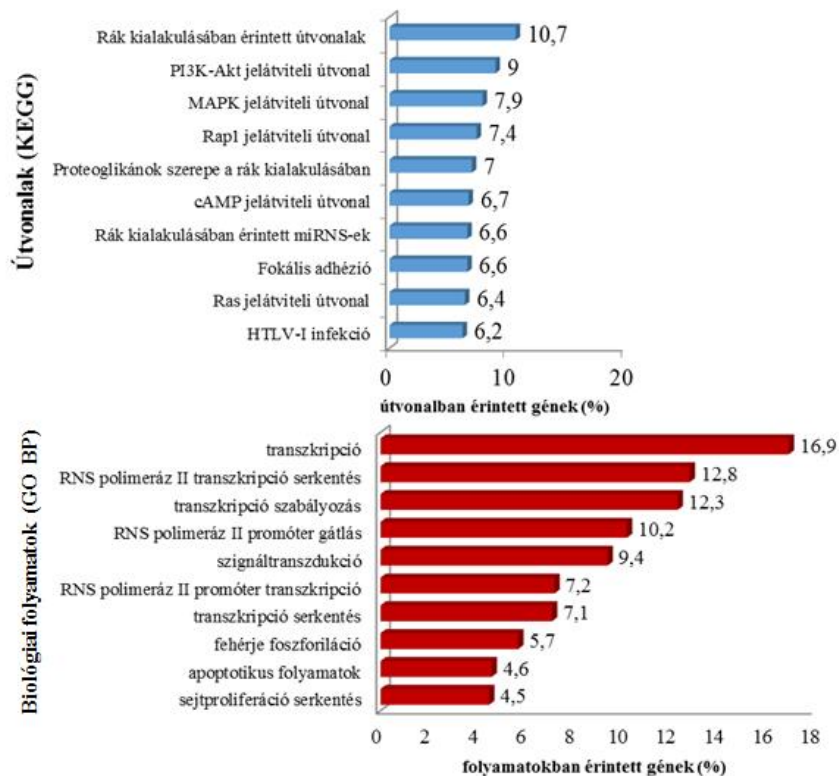


15. ábra. Három kiválasztott miRNS (miR-31, miR-4417, miR-497) és feltételezett célpont mRNS-ik ellentétes irányú kifejeződése microarray eredmények alapján ugyanazon mintákban vizsgálva. Rövidítések: N- egészséges; A- adenóma; AD_T- tubuláris adenóma; AD_{TV}- tubulovillózus adenóma; CRC/C- vastagbélrák;

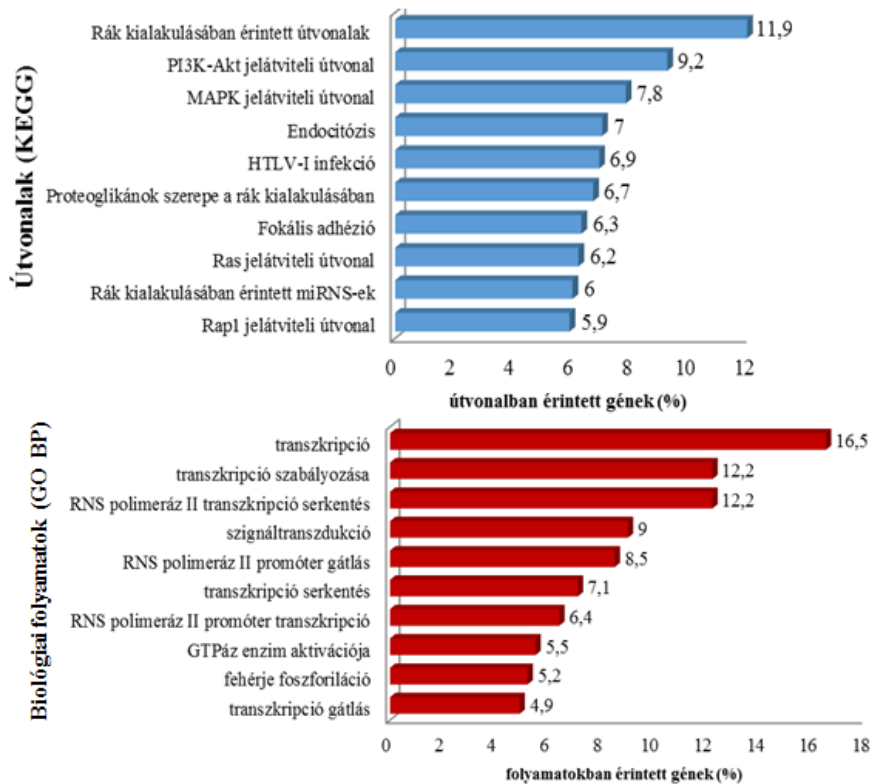
5.3. A megváltozott kifejezésű miRNS-ek jelátviteli útvonalakban betöltött szerepének *in silico* vizsgálata

A 11. ábrán bemutatott, a CRC progressziója során folyamatosan növekedést vagy csökkenést mutató miRNS-ek prediktált célmolekulái az alábbi útvonalakban lehetnek érintettek (16. ábrán). A legtöbb találatot a rák kialakulásában szerepet játszó útvonalak kapták, több mint 10%-os érintettséggel, majd a szabályozó útvonalak közül a rákos elváltozásokban szerepet játszó PI3K-Akt (ID: hsa04151) és MAP Kináz (ID: hsa0401) jelátviteli útvonalakat azonosítottuk. A GO adatbázisban fellelhető biológiai folyamatok elemzése szerint az általunk vizsgált miRNS-ek a transzkripció és a

sejtproliferáció szabályozásában fontosak (16. ábra). Az útvonal analízist azon miRNS-ek prediktált mRNA célmolekuláira is elvégeztük, amelyeknél eltérő kifejeződést mértünk adenómás és vastagbélrákos szövetmintákban az egészségesekhez hasonlítva (12/A. ábra). A prediktált célpont miRNS-ek a rák kialakulásában érintett szabályozási hálózatokban (ID: hsa05200), a PI3K-Akt (ID: hsa04151), a MAP Kináz (ID: hsa0401) jelátviteli útvonalakban és a transzkripcióval kapcsolatos szabályozási folyamatokban kaphatnak jelentős szerepet (17. ábra).



16. ábra. Azon jelátviteli útvonalak listája (kék grafikon), amelyek az általunk vizsgált miRNS-ek prediktált mRNA-ei által érintettek. Az említett miRNS-ek az adenómakarcinóma szekvencia során folyamatosan emelkedett expressziót mutattak vastagbél szövetmintákon. A piros grafikonon a prediktált miRNS-ek biológiai funkcióit ábrázoltuk a GO algoritmus segítségével.

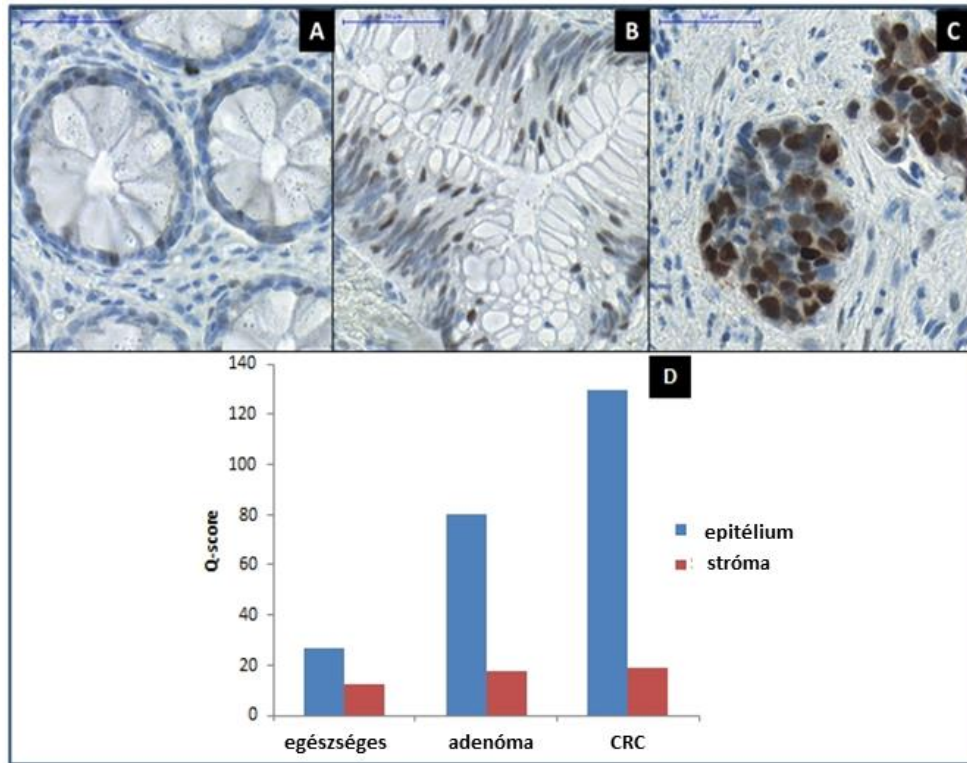


17. ábra. Azon útvonalak listája (kék grafikon), amelyek az általunk vizsgált miRNS-ek prediktált mRNS-ei által érintettek. Az említett miRNS-ek az egészséges vs. neoplastikus elváltozás során megváltozott expressziót mutattak vastagbél szövetmintákon. A piros grafikonon a prediktált miRNS-ek biológiai funkcióit ábrázoltuk a GO algoritmus segítségével.

5.4. A ciklin D1 fehérje kifejeződésének vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

A miR-497 esetében kiválasztottuk az egyik prediktált mRNS célmolekuláját és a feltételezett mRNS-miRNS funkcionális kapcsolatot fehérjeszinten is vizsgáltuk a vastagbél szövetben. Az egészséges hám alacsony, sejtmagi ciklin D1 expressziót mutatott (representatív score értékek: 0; +1; Q-score: 26,66±8,16), a strómasejtek közül viszont csak néhányban tapasztaltunk erős immunreakciót (representatív score értékek: +2 és +3; Q-score: 12,67±3,19;). A stróma ciklin D1 fehérje expressziója kis mértékben, de szignifikánsan ($p < 0,05$) emelkedett adenómában (Q-score: 17,50±5,77) és CRC-ben (Q-score: 19,00±7,34). Heterogén, szignifikánsan növekedő ciklin D1 kifejeződést mértünk az adenóma és CRC minták hámsejtjeiben (representatív score értékek: +2 és +3; adenóma Q-score: 80,00± 17,88; CRC Q-score 129,5±45,85; 18/B-C ábra). Ahogyan az 18/D grafikonon is látható, az ép-adenóma-karcinóma átmenet során mért

teljes ciklin D1 fehérje szintváltozás (normális ΣQ score: $39,32 \pm 8,63$; adenóma ΣQ -score: $96,2 \pm 18,75$; CRC ΣQ -score: $147,00 \pm 48,94$) az hámban mért, megnövekedett ciklin D1 mennyiségéből adódik. Szignifikáns ciklin D1 fehérje kifejeződésbeli ($p < 0,05$) különbséget találtunk az ép-adenóma és az adenóma-CRC hám és stróma összehasonlítás során. A részletes Q-score adatok a 18. ábrán láthatóak.

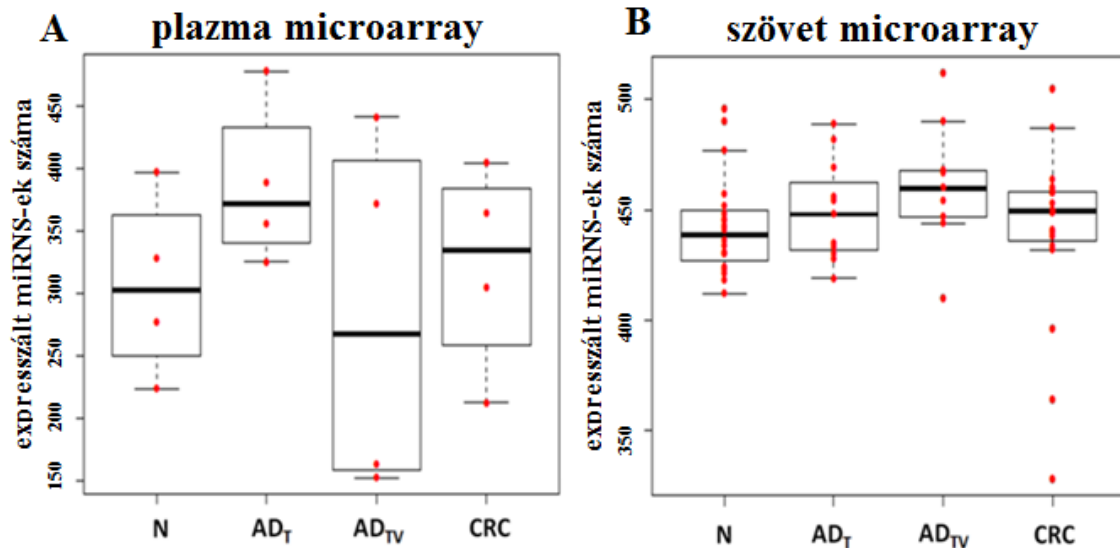


18. ábra. A ciklin D1 fehérje expressziója normális (A), adenóma (B) és CRC (C) mintákban. Mérték: 50 μ m. A D ábrán a betegcsoportokban, a hámban (kék oszlopok) és a strómában (piros oszlopok) mért Q-score értékeket ábrázoltuk. Rövidítések: CRC-vastagbélrák.

5.5. A szöveti- és plazmamintákban megváltozó miRNS expresszió vizsgálata

Tubuláris, tubulovillózus adenóma és vastagbélrákos betegek plazmamintáiból miRNS microarray vizsgálatot végeztünk. Az Expression Console Szoftver (Affymetrix) és az intenzitás értékek alapján meghatároztuk a mintákban megjelenő miRNS-ek számát. Az egészséges kontrollokban 306 miRNS, az adenómás betegekben 334, míg a CRC-s mintákban 321 miRNS kifejeződését tapasztaltuk (19/A. ábra). A kapott eredményeket összehasonlítottuk a biopsziás microarray vizsgálatok során kimutatott miRNS-ek számával (19/B. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a vastagbéliszövetben – függetlenül a

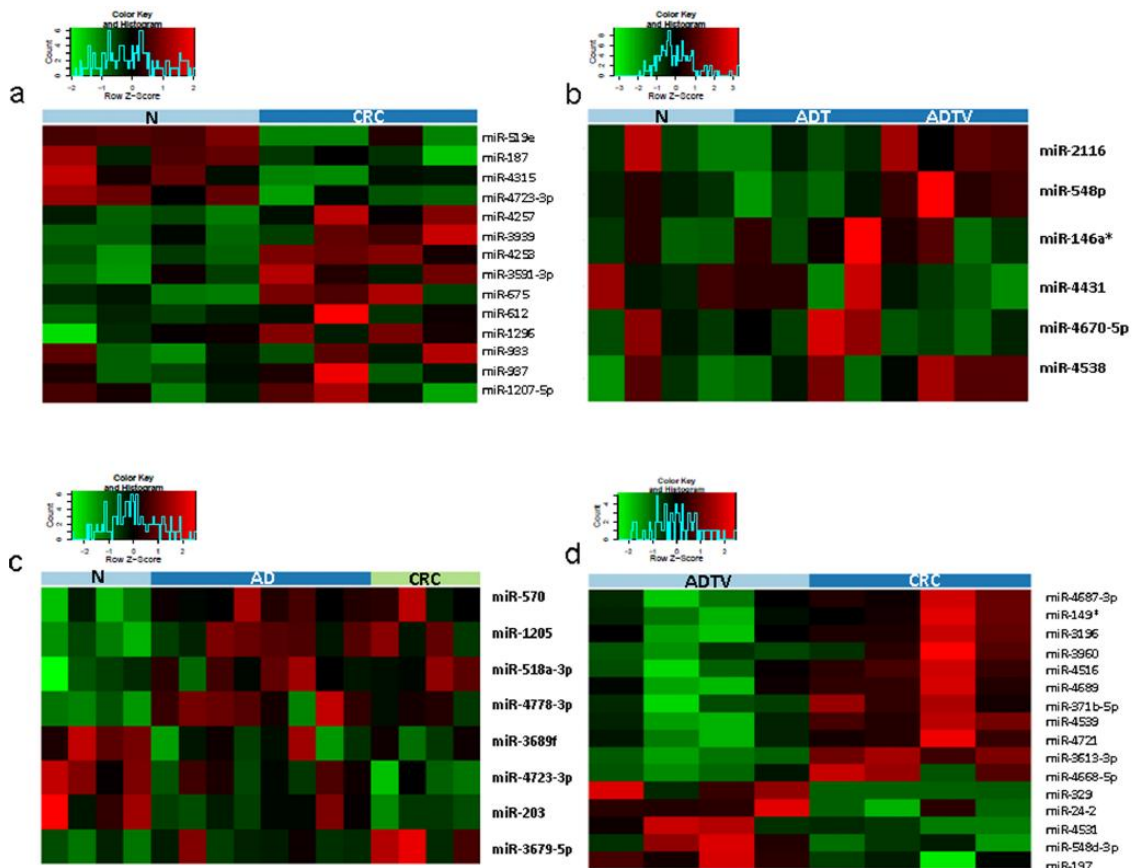
betegcsoportoktól – egy időpillanatban kifejeződő miRNS-ek száma 350-500, plazmában 150-450 tartományban van. Lényeges megemlíteni, hogy adott szöveten belül a vizsgált betegcsoportokban kifejeződött miRNS-ek számában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést.



19. ábra. A párosított plazma (A) és biopszia (B) mintákban kifejeződő miRNS-ek száma az eltérő betegcsoportokban. Összesen 1733 miRNS-t vizsgáltunk GeneChip miRNA 3.0 array módszerrel. Szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést nem tapasztaltunk egyik mintatípusnál sem. Rövidítések: N-egészséges; AD_T- tubuláris adenóma; AD_{TV}- tubulovillózus adenóma; CRC- vastagbélrák.

Habár a kifejeződött miRNS-ek számában nem észleltünk szignifikáns eltéréseket, a különböző klinikai csoportok között eltérő miRNS expressziós profilokat találtunk, amelyeket a 21. ábra mutatja. Az egészséges és vastagbélrákos plazmaminták között 14 miRNS szignifikáns ($p < 0,05$) eltérését mértük (20/A ábra). A szignifikáns különbségek többségét ebben az összehasonlításban találtuk. A szöveti microarray vizsgálatokhoz képest a plazmaminták vizsgálatánál alacsonyabb intenzitás értékeket kaptunk (a leírt miRNS-ek nagy része 1-1,5-szeres expressziós intenzitás értékeket mutatott), azonban a miR-933 esetén majdnem 1,6-szoros növekedést mutattunk ki CRC mintákban az egészségesekhez képest. Nem figyeltünk meg szignifikáns expressziós eltérést a tubuláris adenóma és az egészséges minták között (20/B ábra), de két miRNS (miR-2116, miR-548p) esetén a tubulovillózus adenóma csoportban megnövekedett expressziót tapasztaltunk a normális mintákhoz képest. A neoplasztikus és egészséges

minták között is eltérő kifejeződésű miRNS-eket azonosítottunk. Nyolc miRNS mutatott jellegzetes eltérést a betegcsoportok között ($p < 0,05$) az egészséges mintákhoz képest (20/C ábra). A miR-4723-3p, a miR-203 és a miR-3689f esetén csökkent kifejeződést észleltünk a CRC progressziója során. További 16 miRNS-t azonosítottunk, amelyek elkülönítik a tubulovillózus adenómát a CRC csoporttól, amelyből 11 miRNS esetében szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb expressziót figyeltünk meg a CRC mintákban (20/D ábra).

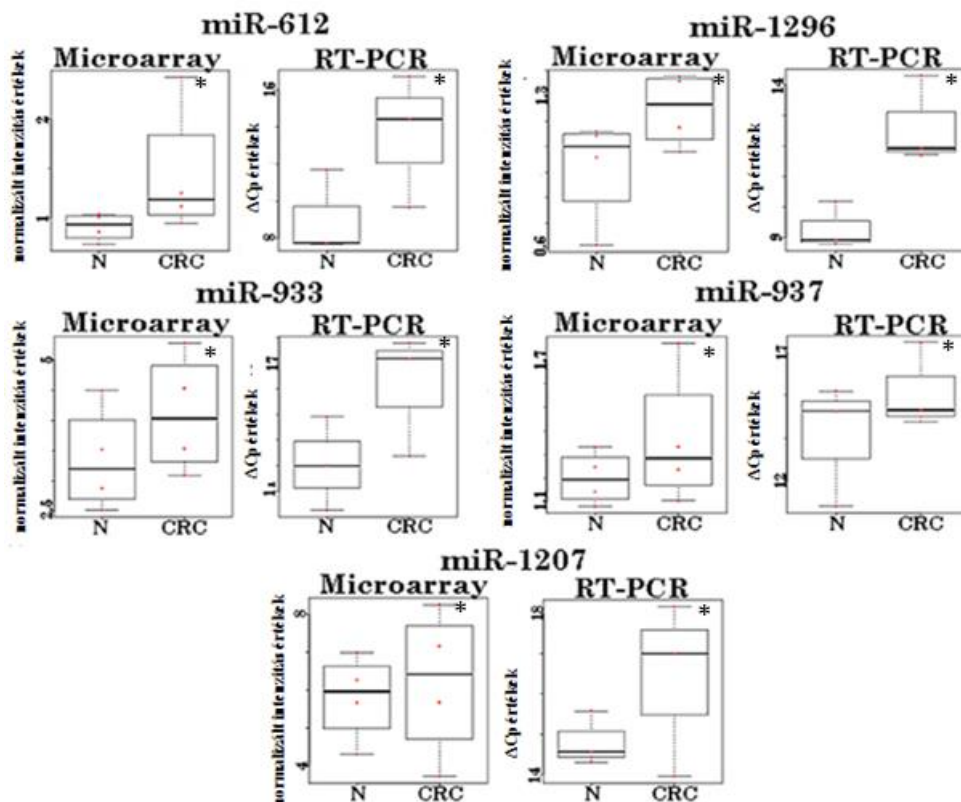


20. ábra. A plazmamintákban kifejeződő miRNS-ek eltérései a vizsgált klinikai csoportok között hőterképen ábrázolva. A piros szín az emelkedett, a zöld szín az alacsonyabb miRNS kifejeződést reprezentálja. **A:** Az egészséges és vastagbélrákos mintákban szignifikáns eltérést mutató miRNS-ek csoportja ($p < 0,05$, $\log FC > |0,5|$). **B:** Az egészséges és rákelző (tubuláris, tubulovillózus) adenóma állapotok között megváltozó miRNS kifejeződés ($p < 0,05$, $\log FC > |0,5|$). **C:** Az ép-adenóma-carcinoma szekvencia során eltérő expresszióval jellemezhető miRNS-ek csoportja ($p < 0,05$, $\log FC > |0,5|$). **D:** Az adenóma szövettani alcsoportok között megváltozó miRNS

kifejeződés eltérései ($p < 0,05$, $\log FC > |0,5|$). Rövidítések: N-egészséges; AD- adenóma; ADT- tubuláris adenóma; ADTV- tubulovillózus adenóma; CRC- vastagbélrák.

5.6. A miRNS expressziós eltérések valós-idejű PCR-rel történő megerősítése plazmamintákban

A microarray módszerrel kapott eredményeink megerősítésére ugyanazon mintákon miRCURY Human Panel I+II valós-idejű PCR módszert alkalmaztunk. A PCR panelek összesen 742 miRNS primert tartalmaztak. A microarray vizsgálatokra alapozva a CRC vs. egészséges minták összehasonlításában a 14 eltérést mutató miRNS közül a miR-187, a miR-612, a miR-1296, a miR-933, a miR-937, a miR-1207, a miR-146a és a miR-675 specifikus oligonukleotidjai találhatóak meg a paneleken. A fent említett miRNS-ek közül a miR-675 kivételével mindegyik esetben kimutattunk PCR terméket, és a plazmamintákon végzett microarray vizsgálat eredményei korreláltak a RT-PCR eredményekkel (21. ábra).

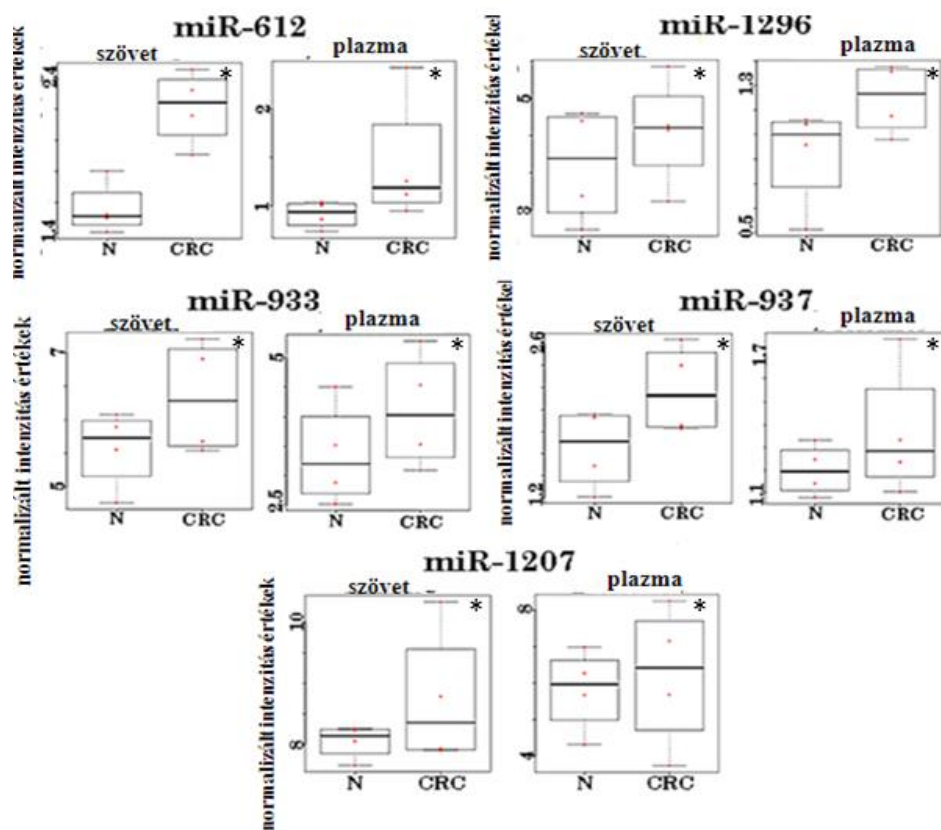


21. ábra. Az egészséges és vastagbélrákos betegek plazmamintáiban észlelt miRNS-ek expressziója két eltérő módszerrel (microarray, valós-idejű PCR) vizsgálva.

Rövidítések: N- egészséges; CRC- vastagbélrákos minta; Cp-áttörési pont.
*Szignyifikáns eltérés ($p < 0,05$): N vs. CRC $p < 0,05$

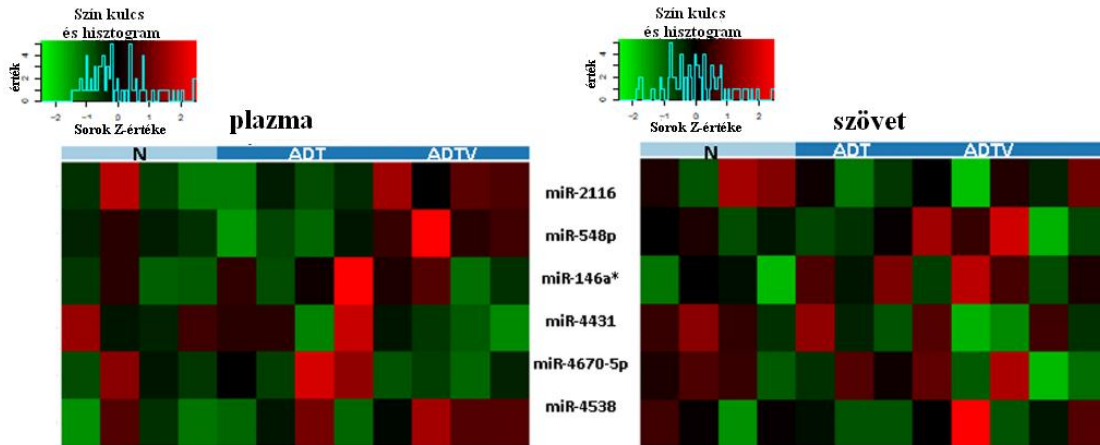
5.7. Plazmaspecifikus miRNS expresszió a párosított szövetmintákban

A párosított szövetmintákon miRNS expressziós profil vizsgálatot végeztünk és a plazma frakcióban eltérést mutató miRNS-eket tovább elemeztük. A miR-612, a miR-1296, a miR-933, a miR-937 és a miR-1207 esetében a miRNS-ek azonos irányú eltérést mutattak az egészséges vs. CRC összehasonlításban, azaz növekvő intenzitást mértünk a CRC mintákban az egészségesekhez képest a szövet- és plazmamintákban is (22. ábra).



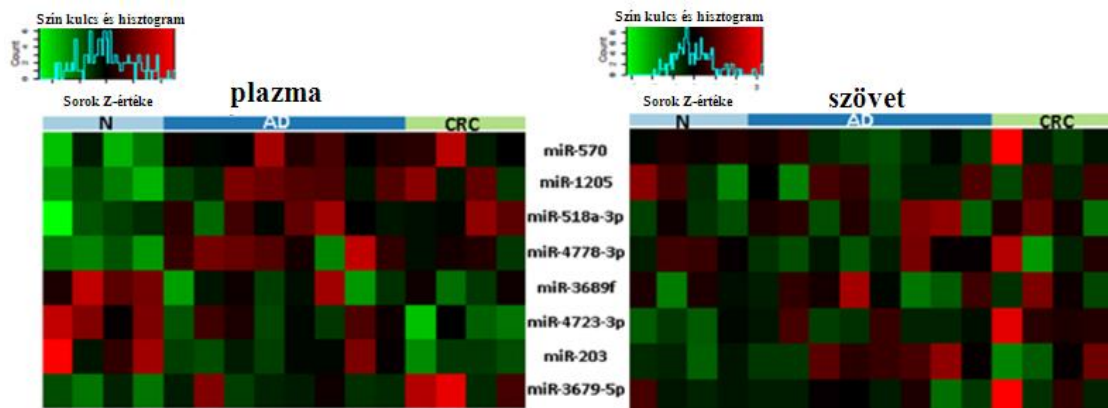
22. ábra. A megegyező irányú kifejeződést mutató miRNS-ek szöveti és plazmamintákban microarray vizsgálatok alapján. Rövidítések: N- egészséges, CRC- vastagbélrákos minta. *Szignyifikáns eltérés ($p < 0,05$): N vs. CRC $p < 0,05$

Az adenóma vs. egészséges összehasonlításban a kiválasztott miRNS-ek nem mutattak megegyező irányú expressziós változásokat a szöveti párosított minták esetén tapasztaltakkal összehasonlítva (23. ábra).



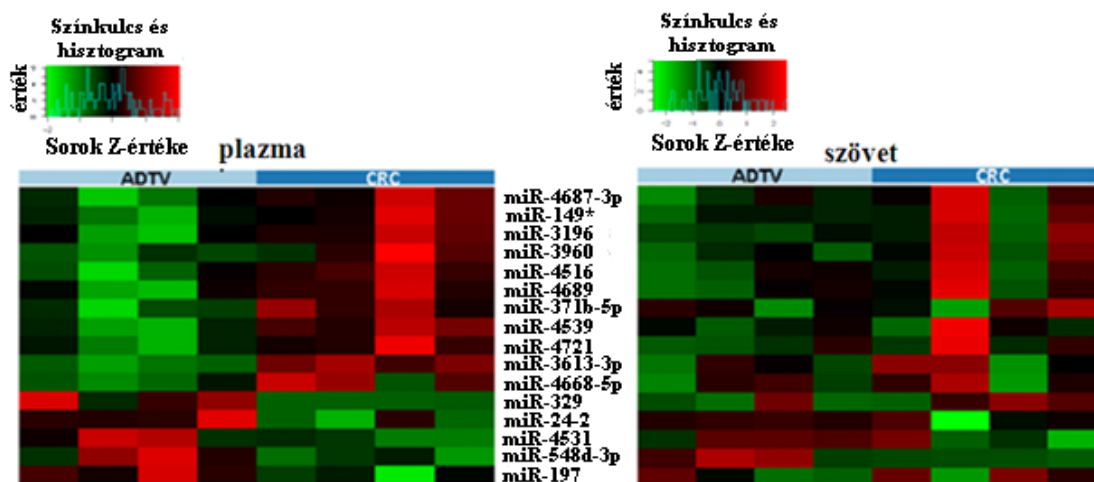
23. ábra. A plazmában észlelt miRNS-ek expressziós profiljai (bal oldali hőterkép) és szöveti párjukban mért kifejeződésük (jobb oldali hőterkép). Rövidítések: N-egészséges; ADT-tubuláris adenóma; ADTV-tubulovillózus adenóma.

A miR-3689f, a miR-4723-3p és a miR-203 egészséges mintákban fokozott expressziót mutatott a neoplasztikus betegcsoporthoz képest, habár ezek a kifejeződések alacsonyabb intenzitásúak voltak, mint az egészséges szöveti párosított mintájukban (24. ábra).



24. ábra. A plazmamintákban az ép-adenóma-karcinóma szekvencia során szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést mutató miRNS-ek expressziós profilja (bal oldali hőterkép) és szöveti párjukban mért kifejeződésük (jobb oldali hőterkép). Rövidítések: N-egészséges; AD-adenóma; CRC-vastagbélrák.

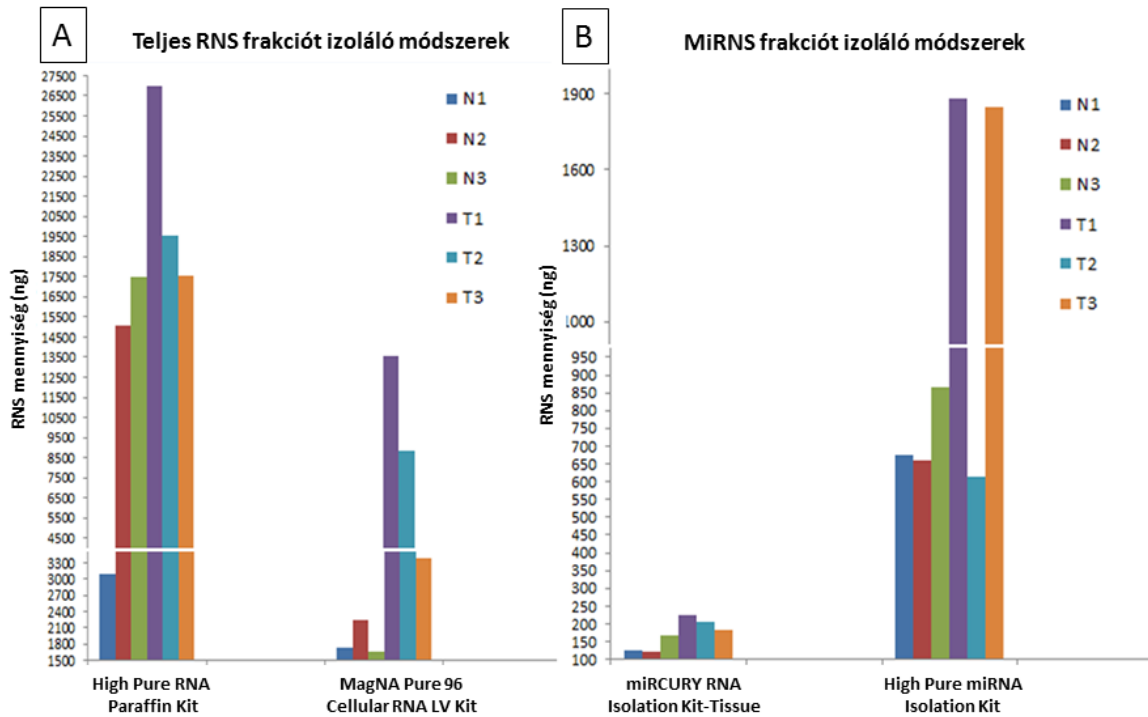
A miR-548d-3p volt az egyetlen miRNS, amelyik az adenóma vs. CRC összehasonlításban mind szöveti mind plazma mintákban azonos expressziós mintázatot mutatott (25. ábra).



25. ábra. A tubulovillózus adenóma és vastagbélrákos betegcsoportok között plazmában eltérő expresszióval jellemezhető miRNS-ek (bal oldali hőterkép) kifejeződése a szöveti párosított mintájukban (jobb oldali hőterkép). Rövidítések: ADTV-tubuláris adenóma; CRC-vastagbélrák.

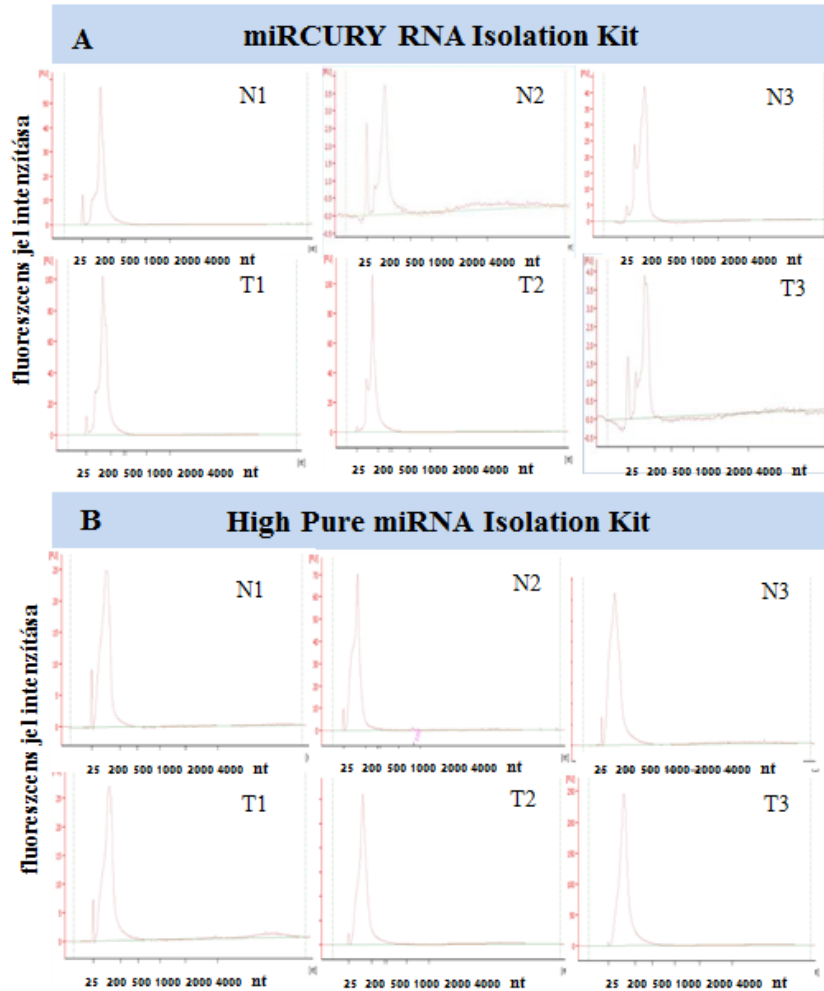
5.8. Az eltérő módszerrel kivont RNS minták koncentrációjának és integráltságának vizsgálata FFPE mintákon

A klinikumban könnyebben kezelhető és tárolható FFPE szövetmintákból feltárható miRNS-ek vizsgálatát is elvégeztük. A különböző eljárásokkal tisztított RNS minták koncentrációját Qubit 1.0 fluoriméterrel határoztuk meg, amelynek eredményei a 27. ábrán láthatóak. A négy izolálási módszer eltérő RNS mennyiségeket eredményezett. A High Pure RNA Paraffin Kittel izolált minták magasabb koncentráció értékeket mutattak, mint a MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit-tel izolált minták (26/A ábra.). A kizárólag miRNS frakciót kivonó módszerek nukleinsav kihozatalát tekintve alacsonyabb RNS mennyiséggel voltak jellemezhetőek a teljes RNS spektrumot izoláló eljárásokhoz képest. A High Pure miRNS izoláló kit (Roche) nagyobb mennyiségű miRNS kinyerésére volt képes az Exiqon cég által gyártott izoláló kithoz viszonyítva (26/B ábra), annak ellenére, hogy a Roche termék általunk tesztelt protokollját elsősorban a paraffinos mintákból történő miRNS izolálásra ajánlják.

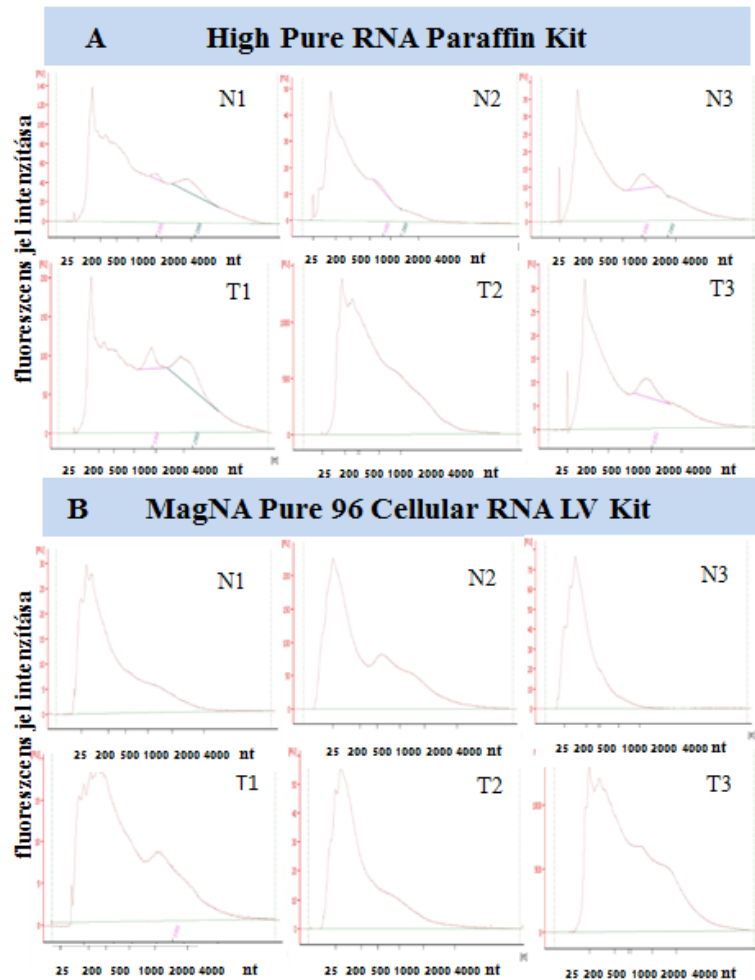


26. ábra. Az egészséges (N1-N3) és tumoros FFPE mintákból (T1-T3) különböző izolálási eljárásokkal kinyert teljes RNS-t (A) és miRNS-t (B) tartalmazó minták koncentrációi. Rövidítések: N- egészséges; T-vastagbélrák. Rövidítések: N- egészséges; T- tumoros minta.

A 27-28. ábrán láthatóak a miRNS és teljes RNS eluátumok elektroforetikus diagramjai az FFPE szövetmintákból. Várakozásainknak megfelelően a miRNS-t izoláló módszerekkel (miRCURY RNA és High Pure miRNA Isolation Kit) történő izolálást követően a mintákban a rövid (20-200) nukleotid hosszúságú RNS fragmentumok voltak jellemzőek nagyobb arányban (27. ábra). A teljes RNS frakciót izoláló módszerek elektroferogramjain (28. ábra) jól látható, hogy a kinyert RNS töredezett, elsősorban a rövid nukleotid-hosszúságú szakaszok jellemzőek.



27. ábra. A kis molekulatömegű RNS minták elektroferogramjai az izolálási módoktól függően. Egészséges minták N1-N3, a tumoros minták T1-T3 jelölést kaptak. A görbék a rövid RNS fragmentumokat rajzolják ki, amelyek feltehetően miRNS-eket is tartalmaznak a miRCURY RNA és High Pure miRNA izoláló kitekkel történt tisztítást követően. Rövidítések: N- egészséges; T- tumoros minta; nt-nukleotid hosszúság.

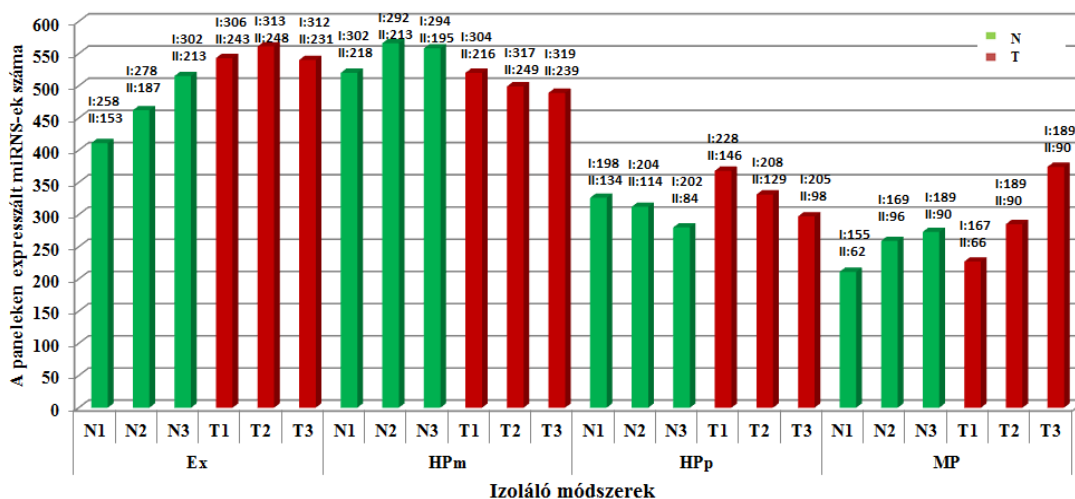


28. ábra. A teljes RNS frakciót tartalmazó minták elektroforetikus görbéi. Egészséges minták N1-N3, a tumoros minták T1-T3 jelölést kaptak. A görbék a szétválasztott teljes RNS frakciókat rajzolják ki, amelyek a rövid nukleotid tartományokban leolvashatók. Rövidítések: nt-nukleotid hosszúság.

5.9. A miRNS profil vizsgálata Exiqon PCR Paneleken a négy különböző módszerrel történő RNS izolálást követően

A két plate-et tartalmazó Exiqon rendszer 742 humán miRNS expressziójáról nyújt információt. A második plate-re – az elsővel szemben – a kevésbé abundáns miRNS-ek primerei kerültek. A PCR eredmények alapján a 40 ciklus alatti értékekkel jellemezhető miRNS-eket pozitív kifejeződésűnek értékeltük a mintákban. Mind a négy izoláló módszer esetén elmondható, hogy több miRNS-t tudunk kimutatni az első panelen, mint a másodikon (29. ábra). Az ábráról az is leolvasható, hogy a rövid RNS frakciót izoláló módszerek mintái nagyobb számban tartalmaznak miRNS-eket, mint a teljes

RNS izoláló kitek használatával tisztított minták. Az egyes mintákban észlelt miRNS-ek számát tekintve a miRNS frakciót izoláló módszerek közül is a Roche kit mutatkozott a legjobbnak.



29. ábra. Azonos mintákból kiindulva, eltérő módon izolált miRNS-ek expressziója az Exiqon PCR Human Panel I + II rendszeren. Az oszlopok felett a mintákban expresszált miRNS-ek számát jelenítettük meg. Rövidítések: HPm - High Pure miRNA izoláló kit; Ex- mIRCURY RNA- Tissue izoláló kit; HPp - High Pure Paraffin izoláló kit; MP - MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit; N -egészséges minta T-tumoros minta; I - 1. számú PCR panel; II - 2. számú PCR panel.

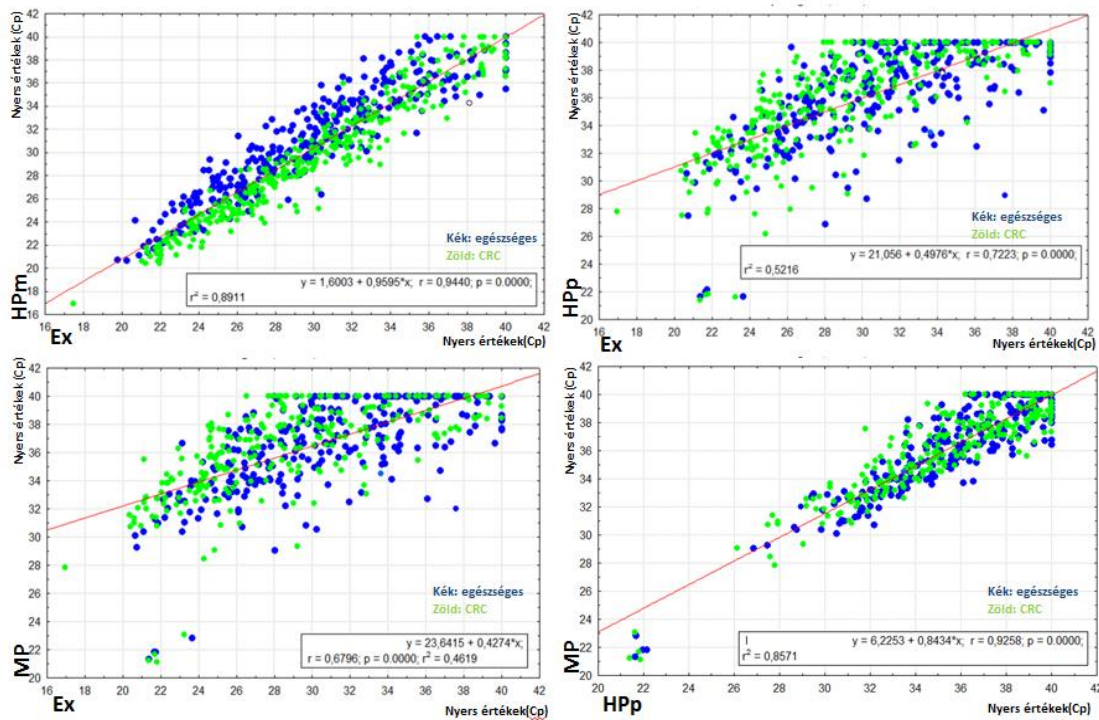
A 7. táblázatban részleteztük az egyes mintákban kifejeződött miRNS-ek százalékos arányát az összes mérhető miRNS-ek számához viszonyítva. Négy csoportot állítottunk fel az alapján, hogy a pozitív jelet adó miRNS-ek három, kettő, egy vagy egyik mintában sem fejeződtek ki az RT-PCR mérések alapján. A kizárólag miRNS-t izoláló módszerek és a teljes RNS frakciót izoláló eljárások között jelentős különbségeket tapasztaltunk. Kétszer annyi miRNS adott jelet az Exiqon és a Roche rövid RNS frakciót izoláló módszerei (egészséges és tumoros minták esetében is) esetén, mint a teljes RNS tisztító eljárásokkal kivont minták esetén. Az egészséges mintákban az Exiqon paneleken megtalálható 742 miRNS 57%-a (n=477), míg a tumoros mintákban a miRNS-ek 72%-a (n=534) volt kimutatható az Exiqon izoláló módszer használatát követően. A Roche High Pure miRNS izoláló módszerrel a normális mintákban a miRNS-ek 69%-a (n=511), míg a tumoros mintákban a miRNS-ek 64%-a (=474) adott értékelhető kifejeződést. A teljes RNS-t izoláló módszerek esetén a vizsgált miRNS-ek

expressziója a fentieknél jóval kisebb arányban (25–38%-ban) bizonyult kimutathatónak.

7. táblázat. Az egészséges és tumoros mintákban kifejeződő miRNS-ek százalékos aránya az összes mérhető miRNS számához viszonyítva. Rövidítések: HPm- High Pure miRNA izoláló kit; Ex- mIRCURY RNA- Tissue izoláló kit; HPp- High Pure Paraffin Kit; MP- MagNA Pure 96 Cellular RNA LV kit; N - egészséges minta T-vastagbélrákos minta

	HPm		Ex		HPp		MP	
	N	T	N	T	N	T	N	T
Három mintában expresszáldó miRNS-ek aránya	69%	64%	57%	72%	28%	38%	25%	32%
Két mintában expresszáldó miRNS-ek aránya	11%	9%	11%	8%	11%	15%	14%	21%
Kizárólag egy mintában expresszáldó miRNS-ek aránya	9%	10%	13%	9%	16%	20%	24%	21%
A mintákban nem expresszáldó miRNS-ek aránya	11%	17%	19%	12%	46%	27%	37%	26%

Ahogy a scatterplot ábrázoláson is látszik, a legnagyobb korrelációt ($r^2 = 0,89$) a High Pure miRNA izoláló módszer (HPm) mutatta az összes többi RNS kivonási módszerhez képest, (30. ábra). A teljes RNS izoláló módszerek esetén magasabb C_p -értékeket figyeltünk meg, ami azzal magyarázható, hogy a teljes RNS frakciónak csak kis hányadát képezték a miRNS-ek.



30. ábra. Az eltérő módon izolált miRNS minták nyers Cp-értékeinek páros összehasonlítása valós-idejű PCR módszerrel. Rövidítések: HPm- High Pure miRNA izoláló kit; Ex- mIRCURY RNA- Tissue izoláló kit; HPP- High Pure Paraffin Kit; MP- MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit.

5.9.1. A vastagbél-specifikus miRNS-ek összehasonlító elemzése

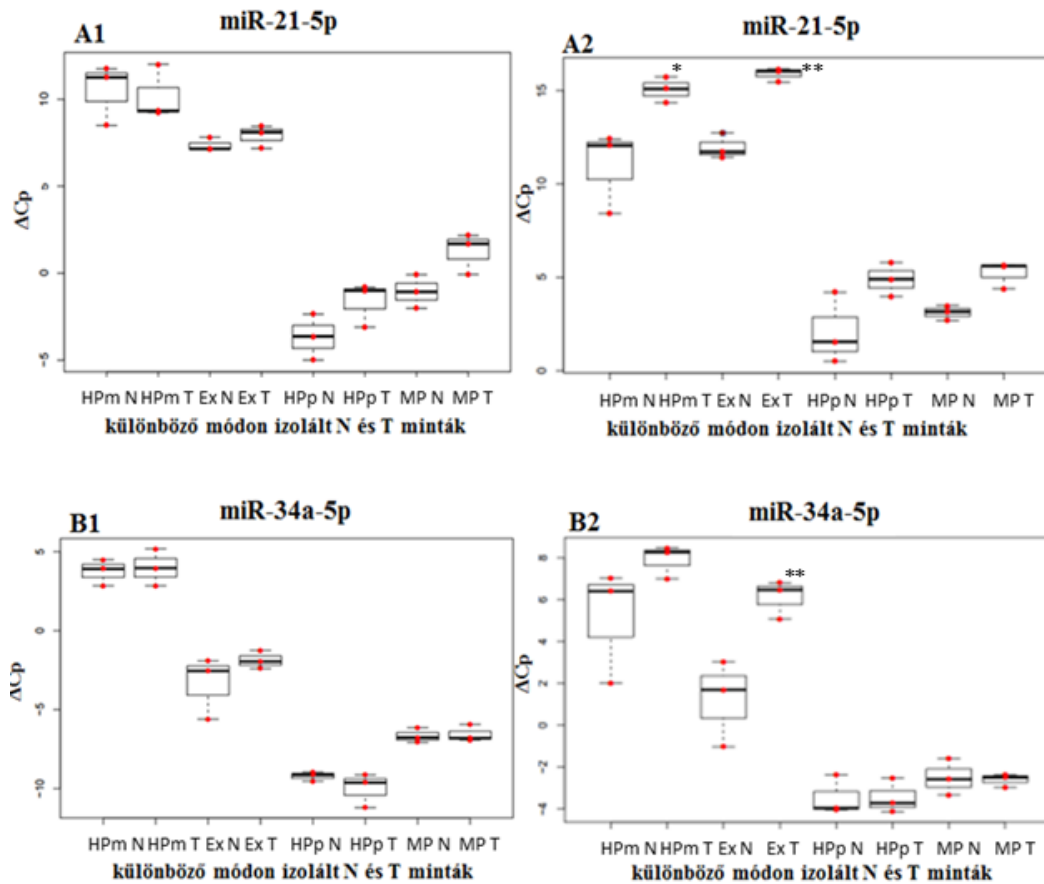
A mintákban kifejeződő miRNS-ek relatív kvantifikációjához referencia miRNS-eket alkalmaztunk. A 8. táblázat mutatja az irodalom szerint leggyakrabban használt (U6, SNORD38B, SNORD49A) és az általunk választott, a mintacsoportok között a legkisebb szórást mutató miR-490-3p referencia miRNS átlagos nyers Cp-értékeit három párhuzamos mérés esetében.

8. táblázat. A referencia miRNS-ek kifejeződése a különböző módon izolált mintákban. Rövidítések: HPm- High Pure miRNS izoláló kit; Ex-miRCURY RNA- Tissue izoláló kit; HPp- High Pure Paraffin RNS izoláló kit; MP- MagNA Pure 96 automata Cellular RNA LV Kit; Cp-áttörési pont.

Izoláló módszerek	HPm				Ex				HPp				MP			
	N		T		N		T		N		T		N		T	
Referencia miRNS-ek	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag	Kifejeződés 3 mintában	Nyers Cp átlag
U6	2/3	34,65±0,1	2/3	35,74±1,2	0/3	NA	1/3	NA	2/3	29,44±0,9	3/3	28,96±1,3	3/3	32,75±3,4	3/3	32,01±1,8
SNORD38B	3/3	28,61±0,3	3/3	29,82±0,9	3/3	28,03±1,10	3/3	24,86±0,8	3/3	26,85±0,3	3/3	26,15±0,5	3/3	29,1±0,2	3/3	29,08±1,0
SNORD49A	3/3	25,52±0,7	3/3	27,15±1,1	3/3	30,24±2,2	3/3	26,18±1,7	3/3	28,68±0,2	3/3	27,94±1,0	3/3	30,56±0,5	3/3	30,93±1,9
miR-490-3p	3/3	32,16±0,5	3/3	31,6±1,6	3/3	32,62±1,8	3/3	32,85±0,2	3/3	32,59±0,8	3/3	32,67±0,2	3/3	33,17±0,7	3/3	33,04±0,5

Annak a kérdéskörnek a tanulmányozásához, hogy a normalizáció céljából alkalmazott különböző referencia miRNS-ek kifejeződése befolyásolja-e a betegcsoportok közötti expressziós eltéréseket, két vastagbélrákra specifikus miRNS-t választottunk ki, és megvizsgáltuk az eltérő referencia miRNS-ekből adódó ΔCp -értékeket a különböző RNS/miRNS izolálási módszerek esetén.

Korábbi tanulmányok eredményei alapján a miR-21 CRC-s szövetmintákban fokozottan expresszálódik, valamint a miR-34 miRNS család tagjai szintén kimutathatóak gasztrointesztinális szövetekből és vastagbélrákos sejtvonalakból. A miR-21 és a miR-34 nyers Cp-értékeit a SNORD38B és az általunk választott miR-490-3p referenciák használatával normalizáltuk. A miRNS izoláló kitekkel kinyert mintákban alacsonyabb Cp-értékeket kaptunk, míg a teljes RNS minták magasabb Cp-értékeket mutattak, azaz a ΔCp -értékek attól függően, hogy miRNS vagy teljes RNS módszert alkalmaztunk, eltérő tartományba estek (31. ábra). Másrészt a klinikai csoportok közötti $\Delta\Delta\text{Cp}$ -értékek az alkalmazott referencia miRNS függvényében is változtak. A miR-490-3p alapú normalizálás esetén a tumormintákban a miR-21 és a miR-34 expressziója fokozódott mind a négy izolálási módszer esetében (31/A2-B2. ábra). Amennyiben a normalizációt a SNORD38B rövid RNS-sel végeztük, ezek a különbségek kisebbek lettek (31/A1-B1. ábra).



31. ábra. A miR-21 és a miR-34a vastagbél-specifikus miRNS-ek kifejeződése a különböző izoláló módszerekkel tisztított mintákban. Első lépésben minden esetben kivontuk a maximális ciklusszámból (45 ciklus) a nyers Cp-értékeket és ezután normalizáltuk. Az **A1-B1** boxplot ábrákon az adott miRNS expressziós értékeit a SNORD38B referencia miRNS értékeivel, az **A2-B2** ábrákon az általunk választott miR-490-3p értékeivel normalizáltuk. Rövidítések: HPm- High Pure miRNS izoláló kit; Ex-miRCURY RNA-Tissue izoláló kit; HPp- High Pure Paraffin RNS izoláló kit; MP- MagNA Pure 96 automata Cellular RNA LV Kit. *Szigifikáns eltérés ($p < 0,05$); ** Szigifikáns eltérés ($p < 0,05$)

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A különböző betegcsoportokban kifejeződő miRNS-ek vizsgálata microarray módszerrel

PhD munkám során nagy áteresztőképességű miRNS expressziós elváltozásokat feltáró szűrést végeztem microarray technológiával vastagbél eredetű egészséges, tubuláris és tubulovillózus adenóma, valamint adenokarcinóma mintákon. A különböző betegcsoportokban összesen kifejeződő miRNS-ek száma azonos tartományba esett (körülbelül 350-500 miRNS) (20. ábra). Slattery és munkatársai hasonló kísérleti elrendezésben szintén kevesebb, mint 600 expresszált miRNS-t detektált a különböző vastagbél szöveti mintáikban microarray technikával (Agilent) [125]. Leidinger és munkatársai az általuk vizsgált 1205 miRNS-ből 331 miRNS-t azonosítottak a kontroll csoportból származó plazmamintákban, a tüdőrákos betegek plazmaiban azonban csak 264 és 364 közötti számokat tapasztaltak [126].

A szakirodalomban található publikációk, amelyek genomszintű, nagy áteresztőképességű miRNS expressziós vizsgálatokat alkalmaznak többnyire az ép-adenóma vagy ép-adenokarcinóma betegpárosításokat vizsgálták [127,128]. Kísérleteink során emiatt nagy hangsúlyt fektettünk az adenómák vizsgálatára, továbbá egészséges vs. rákelőző és neoplasztikus léziók (adenómák és tumoros minták) összehasonlítására is sor került. A klasszikus páros összehasonlításokon (Függelék 1. és 2. táblázat) felül azokra a miRNS-ekre fókuszáltunk, amelyek vagy folyamatosan emelkedő, vagy folyamatosan csökkenő expresszióval jellemezhetőek az adenóma-karcinóma szekvencia során (11. ábra). A kórfolyamat előrehaladásával párhuzamosan folyamatos csökkenést mutató miRNS-ek közül a miR-375-öt, a miR-378-at, a miR-139-5p-t, a miR-133a-t és a miR-422a-t már egyéb kutatócsoportok eredményei alapján is változó kifejeződéssel bírtak a vastagbél kialakulása során [129-136]. A miR-378-ról ismert, hogy részlegesen képes gátolni a vastagbél daganat növekedését és elterjedését célmolekulája, a vimentin fehérje által [132]. A miR-133a funkcionális vizsgálata során kiderült, hogy a LIM és SH3 fehérje alegységeket kódoló mRNS-ek targetálásán keresztül gátolja a vastagbélrákos sejtek növekedését és az áttétképződést [137]. Az általunk is alkalmazott KEGG útvonalelemző-algoritmus szerint a MAPK szabályozó útvonal egyik elemét is képes gátolni [135]. A miR-422a tumorszuppresszor szerepét előrehaladott vastagbél daganatban megfigyelt alacsony expressziójával ismerték fel

[136]. Liu és mtsai. a vastagbélrákban csökkent kifejeződést mutató miR-375 funkcióját tárta fel és megállapították, hogy a miRNS a sejtosztódást közvetetten képes gátolni az *SPI* cink-ujj alegységet kódoló transzkriptum szabályozása által, amely a rákos sejtekben proliferációért, differenciációért és apoptózisért felelős szabályozó struktúra [138]. A miR-139 központi szerepet tölt be a daganatos megbetegedések szabályozási folyamataiban, vastagbélrákban és mellrákban egyaránt alacsony expresszióját mérték [139,140].

Vizsgálataink szerint a miR-503, a miR-4417, a miR-18a, a miR-431, a miR-1246, és a miR-18b voltak az egyedüli olyan miRNS-ek, amelyek szignifikánsan emelkedett expressziót mutattak az ép - adenóma - diszplázia átmenet során. A kórfolyamat során lineárisan növekvő kifejeződéssel jellemezhető miRNS-ek közül a miR-503 emelkedett expresszióját bebizonyították már normális vs. CRC klinikai szövetminták összehasonlításánál, expressziójának mértéke pedig korrelál a tumor méretével [141]. A tumorprogresszióban betöltött szerepe szerint a miR-503 közvetlenül célozza az L1 adhéziós molekula (L1CAM) [142] és E2F transzkripciós faktor 3 (E2F3) [143] mRNS-eket, amelyek érintettek a vastagbél tumor kialakulásban. A miR-17/92 klaszter tagjaként ismert miR-18a tumorszuppresszor szerepe vastagbélrákban a sejt-osztódási ciklus 42 (CDC42) transzkriptum gátlásán keresztül érvényesül [144]. Egy amerikai kutatócsoport egy olyan CRC-specifikus plazma miRNS panelt állított össze, amelynek egyik tagja az általunk is vizsgált miR-431 volt. A panelen található miRNS-ek kifejeződése alapján IV. stádiumú rákos és egészséges mintákat tudtak nagy érzékenységgel elkülöníteni egymástól [145]. A betegcsoportokban növekvő expresszióval mérhető miR-1246 szintje nemcsak vastagbél szövetekben, hanem szérumban is emelkedett CRC-s betegekben, amelynek szintje a reszekciós műtéteket követően lecsökkent [123]. A miR-18a expresszióját gyomorrákban, valamint végbélrákos betegek plazmájában sikerült kimutatni, ahol keringő koncentrációja erősen korrrelált a kemoterápiás kezelést követő nyirokcsomóstátusz állapotával [146].

Eredményeink publikálásával szinte egy időben jelent meg a Sayagués és mtsai. által írt tanulmány, ahol a minták (egészséges és CRC szövet), valamint az alkalmazott technológia (GeneChip miRNA 3.0 microarray) tekintetében is átfedés mutatkozott vizsgálatainkkal [147]. A két vizsgálat eredményeinek összevetését a 32. ábra mutatja. A legnagyobb eltéréseket mutató miRNS-ek mindkét csoportnál megegyeztek.

Esetünkben a megengedőbb feltételek ($p < 0,05$, $\log FC > |1|$) miatt több miRNS-t azonosítottunk a betegcsoportok között.

Sayagués és mtsai.		PhD munkám		
miR-1246	miR-139	miR-4741	miR-30e	miR-378
miR-503	miR-215	miR-106a	miR-10a	miR-378*
miR-3687	miR-215	miR-17	miR-299	miR-375
miR-592	miR-133a	miR-4668	miR-149	miR-10b
miR-183	miR-422a	miR-4640	miR-154	miR-196a
miR-21	miR-375	miR-23a*	miR-10a*	miR-150
miR-424	miR-31	miR-708	miR-145	miR-10b*
miR-1290	miR-4417	miR-3178		miR-196b
	miR-133b	miR-493		miR-30a*
	miR-138	miR-3591		miR-194*
	miR-143	miR-18a		miR-195
	miR-378c/d/f/i/g/e	miR-183*		miR-497
		miR-34b		miR-342
		miR-20b/a		miR-147b
		miR-31*		miR-1
		miR-584		miR-192*
		miR-182		miR-29c*
				miR-664*
				miR-376c
				miR-4645

32. ábra. Egészséges vs. CRC szövetmintákon vizsgált miRNS expressziós eltérések ábázolása Venn-diagrammon Sayagués és mtsai. [147] és saját eredményeim alapján. A klinikai csoportok és módszerek hasonlósága miatt átfedő eredményeket kaptunk a CRC mintákban megnövekedett vagy csökkent kifejeződést mutató miRNS-ek tekintetében. A pirossal jelölt miRNS-ek emelkedett, a zöld színnel jelöltek csökkent expressziót mutattak a vastagbél-daganatos mintákban az egészséges kontrollokhoz viszonyítva.

Az adenómák vizsgálatánál azokra a miRNS-ekre fókuszáltunk, amelyek akár a rákelőző állapotot is előjelezhetik, kiugró expressziós értékeik miatt. A négy adenóma-specifikus miRNS (miR-34a, miR-96, miR-182, miR-183*) közül a miR-96 és miR-182 expressziós eltéréseit már Wang és mtsai. is dokumentálták adenóma és karcinóma mintákban nagy lefedettségű szekvenálással és valós idejű PCR-módszerrel megerősítve [148]. Továbbá a miR-182-ről ismert, hogy az ektonukleozid trifoszfát difoszfahidroláz 5 (ENTPD5) mRNS-t targetálja, amely a metabolikus folyamatokban kap szerepet [149]. Perilli és mtsai. egy korábbi tanulmányában az ENTPD5 mRNS és fehérje alulműködését is leírták vastagbél adenóma-karcinóma átmenet során [150]. A kínai populációban a miR-183* emelkedett expresszióját írták le tüdő adenokarcinómás női betegekben [151], valamint egyik bizonyított célmolekulája a – vastagbél szövetekben is fontos barrier funkciót ellátó – claudin-1, a tight junction sejtkapcsoló struktúrák egyik ismert fehérjéje [152]. A miR-183/96/182 klaszter egy másik tagja is eltérést mutatott az adenóma minták vizsgálata során, amely alkalmával állatkísérletekben érdekes kapcsolatot fedeztek fel a reszveratrol és a miR-96 között. A miR-96 egyik

célmolekulája az egyik legismertebb onkogén, a *KRAS*, alacsony expresszióját detektálták hasnyálmirigy rákban. Azonban az állatkísérlet során a reszveratrollal a miR-96 szintek megemelhetőek voltak a szervezetben, ami a tumornövekedés csökkenését eredményezte a *KRAS* gátlásán keresztül [153]. Vastagbél adenómás és polipos betegek plazmamintáinak vizsgálati eredményei alapján az általunk is vizsgált miR-34a hatékonyan különíti el a két fent említett betegcsoportot egymástól [154].

A Dukes-féle besorolás alapján is összehasonlítottuk a vastagbélrákos mintáinkat. Többnyire fokozott expressziót mértünk a Dukes D stádiumú rákos mintákban a Dukes B állapotúakhoz viszonyítva. Hasonló összevetést végzett egy brit kutatócsoport is, Dukes A, B és C állapotú daganatok vizsgálata során azt találták, hogy a miR-135b képes volt elkülöníteni az alacsony kockázatú B csoportot a magas kockázatú B stádiumtól, azonban a többi csoport közötti expressziós különbségeit nem írták le [155]. Ez a miRNS a mi mintáinkban alacsony intenzitás értékek mellett nem mutatott szignifikáns eltérést a Dukes stádiumok között. A vizsgálatunk során Dukes D mintákban legmagasabb expressziós növekedéssel detektált miR-647 megváltozott expresszióját már több ráktípusban (gyomor [156], kissejtes tüdőrák [157], petefészekrák [158]), is leírták, azonban napjainkig még nem tárgyalták kifejeződését vastagbélrákos mintákban. A miR-196b* (legújabb nevezéktan szerint miR-196b-3p) a prekursor RNS-éről kisebb mennyiségben átíródó változata, amelyet Jeong és mtsai. vizsgáltak részletesebben kasztráció-rezisztens prosztaták sejtvonalon és állatkísérletekben is. Feltárták, hogy az NF- κ B transzkripciós faktor serkenti a miR-196b* expresszióját, fokozott kifejeződése pedig előidézte a rák kialakulását *in vitro* és *in vivo* környezetben is [159]. A vastagbél-daganatokban előfordulását még nem vizsgálták más kutatócsoportok.

Tanulmányunkban nagy hangsúlyt fektettünk a rákmegelőző jóindulatú elváltozások, az adenóma altípusokban megváltozó miRNS eltérések feltérképezésére. Több mint kétszeres csökkenést mértünk az alábbi miRNS-ek esetében tubulovillózus adenómákban a tubulárisokhoz képest: miR-3175, miR-720, miR-4508 és miR-4492. Irodalmi adatok alapján a miR-3175 csökkenő expresszióját már gyomor adenokarcinóma sejtvonalakban is leírták [160]. Érdekes módon a miR-720 szintje mindkét adenóma altípusban megemelkedett az egészséges szövetmintákhoz képest, valamint a tubuláris és tubulovillózus esetek között is szignifikáns eltérést mértük. Mindezekon felül a miR-720 kifejeződésének kezdeti növekedését figyeltük meg az

egészséges - adenóma átmenet során, majd ez az emelkedett koncentráció felére csökkent tubuláris adenóma és tubulovillózus adenóma között. Schopen és mtsai. arról számoltak be, hogy a miR-720 valójában egy tRNS fragmense, és CRC-s betegek szérummintáiban is kimutatható [161,162]. Az adenóma altípusok összehasonlítása során megállapítottuk továbbá, hogy a miR-489 mutatta a legnagyobb expressziós eltérést a két csoport között, azonban a kifejeződésének csökkenését figyeltük meg CRC mintákban. Ezt a miRNS-t is leírták már más tumor típusokban is [163,164]. A 24 miRNS közül, amelyek elkülönítették az adenóma mintákat a karcinómáktól, a felülexpresszált miR-223-at már validálták CRC-ben oncomiR-ként, és a funkcióját a tumorsejtek inváziójához és metasztázis képzéshez is kapcsolják [165]. A vastagbél-daganatok vizsgálatának tekintetében eddig nem feltárt miRNS-ként azonosítottuk a miR-4492-t az irodalomban. A miR-4508 – eddigi információink szerint – a kutatócsoportunk által először vizsgált miRNS a szakirodalomban.

6.2. *In silico* target mRNS predikció és validáció Human Transcriptome Array 2.0 microarray rendszeren

A miR-4417 vastagbél-daganatokban betöltött szerepének hiánya miatt valamint a vastagbél tumorok és egészséges minták között a legnagyobb expressziós különbséget mutató miR-31-et további vizsgálatok alá vetettük. A miR-31 és miR-4417 tumorban felülexpresszált miRNS-ek [166,167] mRNS célmolekuláikat *in silico* módon prediktáltuk. Az általuk potenciálisan szabályozott mRNS-ek (Flavin tartalmú monooxigenáz 4 [*FMO4*], ciklin dependens kináz inhibitor 2B [*CDKN2B*] és prosztaglandin D2 receptor [*PTGDR*]) kifejeződési mintázata ellentétes irányt mutatott a Human Transcriptome Array 2.0 microarray eredményeink alapján. Az *FMO4* a miR-31 által szabályozott transzkriptum, ami a NADPH-függő oxidatív metabolizmusban játszik fontos szerepet, és csökkent expresszióját figyelték meg karcinóma sejtekben [168]. A miR-4417 a CRC-ben alulexpresszált *PTGDR*-t célozza, de az alulműködés lehetséges okát egyes tanulmányok a promóter hipermetilációjának tulajdonítják [169].

6.3. A ciklin D1 fehérjekifejeződésének vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

Korábbi tanulmányok beszámoltak már a konzervált miR-195/497 klaszter szignifikáns alulexpressziójáról gyomor-, emlő-, hólyag-, máj- és vastagbél-daganatokban is [170-175]. A laboratóriumunkban nem volt lehetőségünk a miR-497 és prediktált targetjének

a CCND1 mRNS funkcionális vizsgálatához, azonban irodalmi adatok szerint a különböző tumor típusokon végzett funkcionális vizsgálatok – luciferáz alapú módszerek – rávilágítottak arra, hogy a miR-497 (és a miR-195) közvetlenül targetálja a ciklin-D1 3'UTR régióját [176-178]. Habár máig nincs kísérletes adat a miR-497-CCND1 kapcsolatáról vastagbél-daganatban, feltehetően a ciklin D1 mRNS emelkedett expresszióját a miR-497 alulműködése okozhatja a posztranszkripció módosítás eszközével. További vizsgálatok megerősíthetnék ezt a hipotézist.

6.4. A különböző diagnosztikai csoportokban megváltozó miRNS expresszió vizsgálata plazmamintákban

A perifériás vérben keringő miRNS-ek az alábbi jellemzők miatt lehetnek jó biomarkerek: ellenállóak az RNáz enzim aktivitással szemben, hosszú távú tárolás és többszöri fagyasztás-olvasztási periódusok sem befolyásolják őket. A plazmában megváltozó miRNS koncentráció korrelálhat a különböző betegségekkel és patológiás stádiumaikkal [179]. Kísérleteink során a keringő miRNS-eket vizsgáltunk plazmamintákban vastagbél-daganatos és két eltérő adenómás (tubuláris és tubulovillózus) betegcsoportok között nagy áteresztőképességű microarray módszerrel. Az eredményeinket valós-idejű PCR módszerrel erősítettük meg. Sikertelenül olyan miRNS-eket azonosítottunk, amelyek mind a két módszerrel ugyanolyan expressziós változásbeli tendenciát mutattak a plazmákban.

CRC plazmában az egészséges mintákhoz viszonyítva öt emelkedett kifejeződésű miRNS-t (a miR-612-t, a miR-1296-ot, a miR-933-at, a miR-937-et és a miR-1207-et) detektáltunk mindkét módszerrel megerősítve, majd ezeket a változásokat szövetmintákban is ki tudtuk mutatni. Érdekes módon, Sheng és mtsai. a miR-612 alulműködéséről számoltak be CRC szövetben az egészséges mintákhoz hasonlítva [180]. Emlőrákban leírták, hogy a miR-612 gátolja a miozin II foszforilációját és a metasztázis képzést is [181]. Korábbi tanulmányok szerint a miR-1296 felülexpresszál CRC plazmában, amelyet a mi eredményeink is alátámasztanak [182]. Emelkedett koncentrációját kardiovaszkuláris betegek plazmájában is bebizonyították [183]. Ezzel szemben Shan és mtsai. gyomorrákban tumorszuppresszor funkciót rendeltek működéséhez [184]. Vizsgálati eredményeink szerint a miR-933 expressziója is fokozódott CRC plazmamintákban, azonban az irodalomban ezt a tendenciát csak pajzsmirigyrákban és melanómában írták le [185-187]. A miR-937 szintén a CRC-ben

felülexpresszált miRNS-ek csoportjához tartozott. Zhang és mtsai. tüdőrákban azt találták, hogy célzott terápiás módszerek egyik célmolekulája lehetne, mert gátolja az inozitol polifoszfát-4-foszfátáz II.B. típusú (*INPP4B*) gén működését [188]. A miR-933 és miR-937 miRNS-ekről kevés információ található a szakirodalomban. A KEGG algoritmus szerint a fent említett miRNS-ek prediktált célmolekulái *in silico* módszerekkel meghatározva a „daganatos útvonalakban” (ID: hsa05200), a „vastagbélrák” (ID: hsa05210) valamint a MAPK (ID: hsa04010) és ErbB (ID: hsa04012) jelátviteli útvonalakban kapnak szerepet. A miR-519e alulműködését ($p < 0,05$) figyeltük meg a CRC mintákban az egészséges plazmamintákhoz képest. Habár a miR-519e csökkenését sikerült kimutatnunk microarray-vel, valós-idejű PCR módszerrel ezt nem sikerült igazolnunk. A szakirodalmi megfigyelések alapján ez idáig gyomorrákos szövetmintákban azonosították ezt a miRNS-t, ahol expressziója hasonló tendenciát mutatott az általunk megfigyelttel [189]. Perifériás vérben jelenlétét egy esetben publikálták. Egy H1N1 vírustörzs alapú megbetegedést vizsgáló kutatócsoport azt találta szérumban miRNS profilozást követően, hogy az említett miRNS képes elkülöníteni a fertőzött és az egészséges egyéneket egymástól [190].

Az adenóma hisztológiai csoportosításának további elemzése során megállapítottuk, hogy tubulovillózus adenómában fokozódik a miR-2116 és miR-548p expressziója, az egészséges és tubuláris adenóma mintákhoz hasonlítva. További három miRNS (a miR-570, a miR-1205 és a miR-518a-3p) felülexpresszióját és szintén három (a miR-3689f, a miR-4723-3p és a miR-203) alulműködését figyeltük meg adenóma - karcinóma tranzíció folyamán az egészséges mintákhoz viszonyítva. Li és mtsai. leírták, hogy a miR-548p az akut mieloid leukémia kialakulásáért felelős gének szabályozásában játszik fontos szerepet [191]. A miR-570 expressziója (egyéb miRNS-ek kombinációjával) a túlélés mértékével erős korrelációt mutatott vastagbél- és végbéltumoros mintákban [192]. Wang és mtsai. tanulmánya szerint a miR-570 többek között a CD274 molekulát szabályozza a bélszövetekben. A molekulát kódoló gén gyakran mutálódik gasztrointesztinális rákokban és hozzájárul bizonyos daganatok kialakulásához [193]. A miR-1205 fokozott működésének hátterében az állhat, hogy a gén szekvenciája több más miRNS-sel együtt a plazmocitóma variáns transzlokáció 1 (*PVT1*) fehérjét nem kódoló lókuszon található – a *c-myc* mellett – amelynek onkogén tulajdonságát már bebizonyították [194].

Az adenóma és CRC plazmaminták összevetése során karakterisztikus miRNS eltéréseket figyeltünk meg. Tizenkettő miRNS felülexpresszált CRC-ben, míg öt csökkent expressziót mutatott ezekben a mintákban az adenómákhoz képest. A microarray vizsgálatok során a legnagyobb szignifikáns eltérést szintén ebben az összehasonlításban találtuk, amelyet viszont valós idejű PCR-rel nem sikerült igazolni. A jelentős növekedés mutató miRNS-ek nagy része más jellegű megbetegedésekben is különbségeket mutatott a vérmintákban. Az általunk is detektált miR-149*-ról Sheikh és mtsai. leírták, hogy korona artériával kapcsolatos megbetegedésekben egy ismert keringő prognosztikus biomarker miRNS. Ez a miRNS tumor-asszociált miRNS-ként is viselkedhet apoptózist indukálva azáltal, hogy gátolja az AKT Szerin/Threonin Kináz 1 (*Akt1*) és az E2F Transzkripció Faktor 1 (*E2F1*) géneket a rákos sejtekben [191]. Magas koncentrációja CRC-s betegek plazmamintáiban bizonyítékul szolgálhat tumorszuppresszor szerepére. A miR-3196 plazmában detektálható jelenlétét már Ma és mtsai. is leírták, akik nem kis sejtű tüdőrákos betegeket vizsgáltak és azt találták, hogy a miRNS koncentrációja lecsökken azon betegek plazmájában, akik rezisztensek a betegséget gyógyító Epidermális Növekedési Faktor Receptor (*EGFR*) tirozin kináz gátlóikkal szemben [195,196]. A miR-3960 emelkedett plazma koncentrációját korábban más kutatócsoport is detektálta plazmamintákban. Ding és mtsai. kettes típusú cukorbetegségben szenvedők vérében is eltérő miR-3960 kifejeződést mértek egészséges páciensek véréhez hasonlítva [197]. A plazmában detektálható miR-4516 jelenlétét többek között a koszorúér-betegségekben [198], HIV vírus okozta neurokognitív betegségekben és amiotrófiás laterálszklerózisban szenvedőknél is [199] leírták már. A miR-371b perifériális vérben történő detektációjáról még nincs ismeretünk, azonban szöveti kifejeződése a kondroszarkómás betegeket az egészségesektől hatékonyan elkülönítette [200]. A miR-4539 CRC-specifikus jelenlétéről Pellatt és mtsai is említést tettek, eredményeik alapján alkalmas a colon és a rektális minták elkülönítésére [201]. Az általunk CRC plazma mintákban detektált csökkent kifejeződésű miR-197 B-sejtű limfómában is csökkenő tendenciát mutatott az egészséges mintákhoz viszonyítva [202]. Yan és mtsai. exoszóma-eredetet is igazoltak [203]. Vastagbéliszövetben detektált kifejeződéséről Xu és mtsai. írtak, miszerint expressziója erősen korrelál a betegek túlélési rátájával [204]. Habár a plazma mintákban jelentős eltérést mértünk a tubulovillózus adenóma és CRC plazma minták között ez a különbség nem volt fellelhető a szöveti szinten. A miR-24-2-ről vérmintákon tesztelve kimutatták, hogy a CRC egy ún. negatív biomarkere lehet,

ugyanis szintje negatívan korrelál különböző vér kémiai paraméterek (szuperoxid-diszmutáz, glutation, aszpartát-transzamináz, alanin-transzamináz, kolesszterin, triglicerid) koncentrációjával [205].

Kísérletes eredményeink alapján elmondható, hogy a cirkuláló miRNS-ek expressziójának változása nem minden esetben tükröződik a szövetmintákban. Emellett bár kisebb hányadban, de sikerült olyan miRNS-eket is azonosítanunk (a miR-187-et, a miR-675-öt és a miR-3591-3p-t), amelyek CRC esetén mindkét mintatípusban felülexpressziót mutattak. A miR-187 alulműködését CRC szövetben Wang és mtsai. is bebizonyították, és leírták, hogy ez a miRNS gátolja a rákos sejtek proliferációját, valamint csökkent működését rövidebb túléléssel hozták összefüggésbe [206]. Másik szálról átíródó változatát (miR-187*) gyomorrákos betegek vérszérumában vizsgálták, ahol a betegségben megnövekedett koncentrációja potenciónalis biomarker funkciókkal bírt [207]. Lin és mtsai. a miR-187-ről bizonyították be, hogy fejnnyaki daganatos betegekben szöveti kifejeződése megemelkedik. Ismert target mRNS-ét a BarH-szerű Homeobox 2 (*BARX2*) gén kódolja, amely az áttétképződésben és sejtvándorlásban kap szerepet [208]. Egy másik tanulmány szerint a miR-675 fokozott expressziót mutatott CRC szövetben és plazmában is [209]. A miR-3591-3p szöveti és vérben detektálható kifejeződéséről nem találtunk információt a szakirodalomban.

A miR-548d-3p volt az egyetlen olyan miRNS, amely ugyanolyan irányú – csökkenő–elváltozást mutatott adenóma és CRC összevetés során plazma- és szövetminták esetén is. A miR-548d-3p kifejeződését vastagbélmintákon eddig még nem vizsgálták, azonban a szakirodalomban leírták, hogy szerepe van a mell-daganatok és hasnyálmirigy-rák kialakulásában [210]. Mellrákos szövetmintákban eredményeinkkel ellentétben emelkedett DNS kópiaszámot figyeltek meg az egészséges mintákhoz viszonyítva. A kutatók megállapították, hogy közvetlenül apoptózis gátlást és sejtproliferációt indukál rákos sejtekben [211].

Az eredményeink azt mutatták, hogy a miRNS-ek szöveti és plazma kifejeződése közti átfedés minimális. A saját adatainkkal egybehangzóan Larrea és mtsai. is azt a megállapítást tették, hogy a keringő miRNS-ek nem feltétlenül csak a tumor szövetből származhatnak [212]. A keringési rendszerünkben megjelenő daganat-specifikus miRNS-ek feltehetően más szövet típusokból (mint például az immunsejtekből vagy metasztatizáló távoli szövetekből) és nem kizárólag a primer tumorból származnak

[212,213]. A cirkuláló miRNS-ek elváltozása fontos kapcsolódási pont lehet a célzott terápia és rák között [179,214].

6.5. Az eltérő módszerekkel izolált FFPE minták RNS koncentrációjának és integritásának vizsgálata

Az FFPE szövettani technika alkalmazásával a szövetek megőrzik szerkezeti integritásukat azonban az eljárás egyik fő korlátja, hogy a belőle izolált RNS mennyisége és minősége alul marad a friss fagyasztott szövetmintákhoz hasonlítva [58]. Már bizonyított, hogy a paraffinos blokkokból is sikeresen izolálható miRNS [61], azonban az eltérő izoláló módszerekkel kinyert miRNS tartalmú mintákban a mintákban detektálható miRNS-ek expresszióját tekintve különbségeket lehet felfedezni. A 9. táblázatban találhatóak azokat az izoláló kiték, amelyekkel különböző kutatócsoportok FFPE mintatípusokból sikeresen izoláltak miRNS-eket a kísérlet további vizsgálataihoz. A feltüntetett kutatócsoportok több alkalommal teljes RNS izoláló módszereket alkalmaztak feltehetően azért, hogy a miRNS-ek szabályozó mechanizmusairól információt szolgáló, nagyobb fragmenshosszúságú mRNS célmolekulák is kinyerhetővé váljanak ugyanabból a mintából.

9. táblázat. A szakirodalomban található RNS izoláló módszerek, amelyekkel miRNS frakciót tisztítottak további vizsgálatokhoz. Rövidítések: FFPE- formalinban-fixált, paraffinba-ágyazott.

szövettípus	izoláló kit és gyártó megnevezése	referencia
FFPE	TRIZOL módszer	[215]
FFPE	RecoverALL teljes RNS izoláló kit (Ambion, USA)	[216-219,61,220]
FFPE	High Pure miRNS izoláló kit (Roche Applied Science, Németország)	[221,222]
FFPE	High Pure RNA Paraffin izoláló kit (Roche Applied Science, Németország)	[223]

A PhD munkám során négy kereskedelemben elérhető izoláló módszert hasonlítottunk össze a miRNS frakció kinyerésének minőségi és mennyiségi szempontjából. Továbbá annak érdekében, hogy vizsgáljuk a tesztelt módszerek további alkalmazhatóságát valós-idejű PCR expressziós vizsgálatokat végeztünk az Exiqon által gyártott Human Panel I + II használatával. A kiválasztott izoláló kiték közül több tanulmányban is alkalmazták már miRNS-ek kinyerésére a High Pure miRNS izoláló módszert [221,222], valamint a teljes RNS tartományt tisztító High Pure RNA Paraffin Kitet is

[223]. Minden esetben elégséges mennyiségű RNS-t tudtak kinyerni a mintákból a további vizsgálatokhoz. Az Exiqon cég miRNS izoláló termékei közül a legelterjedtebb, a testfolyadékokra fejlesztett miRCURY biofluid izoláló kit [224], szövetre optimalizált változatát elvéve használják az irodalom szerint. Eredményeinkben az RNS tartalom magasabbnak mutatkozott a többek által használt High Pure miRNA izoláló kit esetében, mint az Exiqon módszerrel izolált mintákban. Az egészséges minták elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a High Pure miRNA izoláló kit használata után detektálható miRNS-ek száma magasabb volt annak ellenére, hogy az izolált RNS mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt az miRCURY RNA izoláló kithez mérve. A teljes RNS frakció mennyisége a High Pure RNA Paraffin Kitet alkalmazva magasabb volt, mint a MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit automata rendszer használata esetén.

A miRNS mennyiségi meghatározását számos tanulmány spektrofotométerrel végzi [225,226,61,222], amely viszont a szövetmintákban mérhető miRNS tartomány alacsony koncentrációja miatt nem megbízható miRNS kvantifikációs módszer, mivel a lehetséges DNS és RNS kontamináció miatt a technika túlbecsülheti a molekulák mennyiségét. Ennek a problémának a kiküszöbölésére, kísérleteinkben a fluorimetriás RNS meghatározást használtuk, amely sokkal specifikusabb detekciót eredményez a koncentráció mérések során és használata egyre elterjedtebb a miRNS kutatás területén is [227,223]. Az RNS és miRNS minőségére vonatkozó vizsgálataink azt mutatták, hogy a High Pure miRNA izoláló kit és az Exiqon miRCURY RNA izoláló kit egyaránt sikeresen ki tudta nyerni a miRNS frakciót. Az elektroforetikus diagramon látható karakteres csúcs a 200 bázispár méretű tartomány alatt a mintákban található rövid RNS tartalmat mutatta (27. ábra).

A 28. ábra elektroferogram képe alapján a teljes RNS-t izoláló módszerek esetén is feltételezhető a miRNS frakció jelenléte a mintákban, amit a valós-idejű PCR módszerrel is visszaigazoltunk, azonban hatékonyságuk alul marad a miRNS-frakciót izoláló módszerekkel szemben (7. táblázat). Az RNS integritás további vizsgálata során megállapítottuk, hogy miRNS és teljes RNS frakciót tartalmazó mintáink alacsony RIN értékkel jellemezhetőek. Egyrészt ez a jelenség a formalinban-fixált, paraffinba-ágyazott szövet feldolgozási eljárásból fakadhat [61], másrészt a rövid RNS-t tartalmazó mintákból hiányoznak a – RIN-érték meghatározásához szükséges – hosszabb nukleotidfragmentumok. A későbbi valós-idejű PCR vizsgálataink eredményeit

támasztja alá Jung és munkatársainak megállapításai, amely szerint az mRNS molekulák bomlása nem jár együtt a miRNS-ek destabilizációjával. Továbbá azt is leírták, hogy az RNS minőségét jelző RIN érték nem szükséges a miRNS-ek intaktságának meghatározásához [226].

Eredményeink szerint a miRNS kinyerése részben sikeres volt a teljes RNS frakciót izoláló High Pure RNA Paraffin Kit és az automata MagNA Pure 96 Cellular RNA LV Kit módszerekkel is. AZ FFPE mintákból elegendő RNS mennyiséget sikerült izolálnunk, és megállapítottuk, hogy a rövid RNS fragmentum tartomány tartalmazott miRNS-eket is, amiket valós-idejű PCR módszerrel is alátámasztottunk. Li és mtsai. eredményei szerint robusztus miRNS profil mérhető a paraffinos mintákból, amelyeket teljes RNS izoláló módszerrel nyertek ki [61]. Kísérleteink azt mutatták, hogy kevesebb miRNS kimutatható a mintákban, ha teljes RNS izoláló kitet használunk, mint ha miRNS-specifikus kittel tesszük ugyanezt. A valós idejű PCR módszerrel kapott eredményeinket összehasonlítva a négy módszer tekintetében általánosságban elmondható, hogy a miRNS izoláló módszerekkel magasabb miRNS expressziós értékeket kaptunk mind a két panelen, mint a teljes RNS-t izolálókkal. Ezzel ellentétben, a teljes RNS mintákban magasabb volt a PCR-rel mért sikertelen/sikeres reakciók aránya (8. táblázat).

6.5.1. A vastagbél-specifikus miRNS-ek összehasonlító elemzése

Annak érdekében, hogy az izolált miRNS mintákat további kvantifikációs vizsgálatok alá vegyünk, kiválasztottunk két az irodalomban gyakran vizsgált vastagbélrák-specifikus miRNS-t (a miR-21-et és a miR-34-5p-t). Az expressziós intenzitásuk meghatározásához referencia miRNS-eket alkalmaztunk. A megfelelő referencia miRNS kiválasztása kritikus a miRNS expressziós tanulmányok szempontjából, mert a miRNS kifejeződés nagymértékben függ a normalizáció során alkalmazott referencia miRNS-től. Más kutatócsoportok is célul tűzték ki, az ideális referencia miRNS felkutatását CRC mintákban. Boisen és mtsai. is nagy figyelmet fordítottak egy olyan univerzális referencia miRNS kiválasztására, amellyel a vastagbélrákos FFPE típusú szövetminták biológiai replikátumai között csökkenteni lehessen a különbségeket. Tanulmányukban a miR-103a-3p-t választották ki erre a célra [222]. Lehetőségünk volt megvizsgálni a fent ajánlott miRNS kifejeződését a mintáinkban és azt találtuk, hogy a miR-103a-3p nemcsak az egészséges és tumoros szövetmintákban mutat eltéréseket,

hanem a különböző izoláló módszerek is befolyásolják kifejeződését az Exiqon Human Panel I+II plate-eken detektálva. Kísérletünkben az általánosan elfogadott és széles körben használt U6 RNS-t is vizsgáltuk ebből a szempontból [105,228]. Érdekes módon kísérletünkben a mintákban mérhető hiányos kifejeződése miatt nem volt alkalmas normalizálásra. Hasonló eredményekről számolt be Peltier és Latham is, akik 12 kandidáns referencia miRNS vizsgálata során az U6-ot találták az egyik legkevésbé megbízható referencia miRNS-nek. Eredményeik szerint a miR-191, a miR-103 és a miR-17-5p jelöltek voltak a legideálisabbak a minták közötti expressziós különbségek kiegyenlítésére [229]. Másik két elterjedten alkalmazott referencia RNS, a SNORD 38B és -49A viszonylag nagy szórással expresszáltak mintáinkban [230,231] (8. táblázat). A fent említett megfigyelések miatt vizsgálataink során referencia miRNS-ként kijelöltünk egy olyan miRNS-t (miR-490-3p), amely a legkisebb eltérést mutatta a betegcsoportok között. A miR-21-et irodalmi adatok alapján választottuk ki vizsgálatainkra, amely szerint a vastagbélrákban fokozott expressziót mutat [128]. A miR-490-3p referencia miRNS normalizációjával a miR-21 erős kifejeződését a CRC-s mintákban mi is alátámasztottuk. A SNORD 38B (más néven U38B vagy RNU38B) rövid RNS-t számos tanulmányban használják referencia RNS-nek, habár az általunk kapott nyers adatok ezzel történő normalizálása már nem mutatta a nagyfokú eltérést a normál és CRC minták között [232,233]. A további vizsgálatok alá vetett vastagbélrák-specifikus miR-34a-5p-ről több kutatócsoport is beszámolt. Többféle ráktípusban és CRC-ben is csökkent kifejeződésről számoltak be [234-236], amely saját tapasztalatainkkal összhangban volt. A mi eredményeink is ezeket az eredményeket támasztották alá. Eredményeink azt sugallják, hogy a referencia miRNS helyes kiválasztása kritikus lépés annak érdekében, hogy a megbízható eredményeket kapjunk a miRNS expressziós profil vizsgálatok során.

6.6. Legfontosabb új megállapítások és megfigyelések

- megállapítottam, hogy az egészséges, adenómás és adenokarcinómás vastagbéliszövetben és párosított plazmamintákban kimutatható miRNS-ek számában nem található szignifikáns eltérés;
- négy adenóma-specifikus miRNS-t (a miR-182-t, a miR-183*-t, a miR-96-t és a miR-34a-t) azonosítottam, amelyek közül a miR-183* eltérő kifejeződését elsőként figyeltem meg vastagbél adenóma szövetmintákban;

- korai (Dukes B stádiumú) és az előrehaladott (Dukes D stádiumú) vastagbélrákos szövetminták között eltérő miRNS expressziós mintázatot határoztam meg, ezek közül is a miR-647-et és a miR-196b*-ot először azonosítottam vastagbélrákos mintákban;
- vastagbél daganatban először vizsgáltam a miR-497-ciklin D1 kapcsolatát, amely során bebizonyítottam a ciklin D1 mRNS emelkedett expresszióját és a miR-497 alulműködését, és a feltételezett kapcsolatot a ciklin D1 fehérjeszint növekedésével sikerült alátámasztanom;
- a vastagbél adenómák szövettani altípusait (tubuláris és tubulovillózus adenómákat) elkülönítő miRNS mintázatot írtam le szöveti és perifériás vérmintákban egyaránt. A miR-4492-t elsőként azonosítottuk vastagbél szövetmintákon;
- öt olyan miRNS-t (a miR-612-t, a miR-1296-t, a miR-933m-t, a miR-937-t és a miR-1207-t) azonosítottam plazmamintákban, amelyek vastagbél daganatban fokozott kifejeződést mutattak az egészséges mintákhoz viszonyítva, magas szintjük a vastagbél szövetekben is kimutathatónak bizonyult;
- az alkalmazott miRNS frakciót izoláló módszerek közül a High Pure miRNA izoláló kit használatával nyertem ki a legnagyobb mennyiségű miRNS-t a szövetmintákból;
- két tumorspecifikus miRNS (miR-21, miR-34a-5p) vizsgálatával bebizonyítottam, hogy a betegcsoportok közti miRNS expressziós eltérések torzulhatnak, ha nem a megfelelő referencia miRNS-sel normalizálunk. Kísérleteimben rávilágítottam arra, hogy a miR-490-3p a vastagbél szövetminták PCR alapú vizsgálatakor ideális referencia miRNS lehet.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A szakirodalomban elsősorban az egészséges és a vastagbélrákos szövetminták miRNS mintázatának összehasonlítása jellemző. PhD munkám során a CRC-s mintákon kívül nagy mintaszámú adenóma mintacsoportban is sikerült miRNS expressziós eltéréseket kimutatnom, amelyeket valós-idejű PCR módszerrel is megerősítettem. Kísérleteim során adenóma-specifikus miRNS-eket azonosítottam, amelyek a legmagasabb expressziós szinttel jellemezhetőek ebben a betegcsoportban. Megfigyeléseim szerint adenómákban általánosságban nagyobb mértékben fejeződnek ki a miRNS-ek a vastagbélrákos mintákhoz viszonyítva. Munkám során az adenóma szövettani alcsoportokat (tubuláris és tubulovillózus) elkülönítő miRNS-eket is meghatároztam. Egy kiválasztott miRNS, a miR-497 szabályozó funkciójának tanulmányozása során a ciklin D1 fehérje poszttranszkripcionális gátlásának eredményét fehérjevizsgálatokkal is alátámasztottam.

Perifériás vérben a fenti betegcsoportok között megfigyelhető miRNS eltéréseket azonosítottam. A miR-187, a miR-612, a miR-1296, a miR-933, a miR-937, a miR-1207 és a miR-146a esetében megállapítottam, hogy kifejeződésük CRC szöveti és plazmamintákban egyaránt eltérést mutat az éphez viszonyítva.

PhD munkám során formalinban fixált, paraffinba ágyazott vastagbéliszövet mintákból eltérő izolálási módszereket alkalmazva miRNS, illetve teljes RNS frakciót nyertem ki. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a teljes RNS kivonással kapott mintákban jelenlévő miRNS-ek koncentrációja elmarad a kizárólag miRNS frakciót izoláló módszerekhez képest. Az irodalomban javasolt referencia miRNS-ek vizsgálataim során nagy szórást mutattak az eltérő betegcsoportok között, ezért egy általunk választott új, az irodalomban még nem közölt miRNS-t, a miR-490-3p-t alkalmaztuk referenciaként, amely az egészséges és vastagbél-daganatos betegekből származó mintákban is legkisebb szórást mutatta. A betegcsoportok közötti eltérések elemzése során fontos szempontként jelöltem meg a referencia miRNS megfontolt kiválasztását, ugyanis a normalizációs lépés nagymértékben befolyásolja a vizsgálni kívánt miRNS-ek expresszióját.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

8.1. Magyar összefoglaló

A mikroRNS-ek olyan rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, amelyek posztrankripciós módosításon keresztül befolyásolják célmolekuláik kifejeződését. Adott miRNS-ek expressziós mintázatának változása információval szolgálhat vastagbél ép-adenóma-karcinóma szekvencia progressziójáról. PhD munkám során feltérképeztem a vastagbélrák kialakulása során megjelenő miRNS expressziós eltéréseket tubuláris, tubulovillózus adenómákban, és CRC-s mintákban. A betegcsoportok páros összehasonlításával stádiumspecifikus miRNS profilokat állapítottam meg. A miR-497 feltételezett szabályozási folyamatát a ciklin D1 fehérjeszint vizsgálatával bizonyítottam. Plazmaminták elemzése során is eltérő miRNS kifejeződési mintázatokat írtam le. A miR-187, a miR-612, a miR-1296, a miR-933, a miR-937, a miR-1207 és a miR-146a fokozott kifejeződését többféle módszerrel is igazoltam vastagbélrákos betegek plazmamintáiban. Az előzőekben említett miRNS-ek kifejeződésének változását szövetmintákban is megfigyeltem. Több mint 700 miRNS egyidejű vizsgálatával különböző RNS izoláló módszereket vettem össze. A vizsgálat során arra kerestem választ, hogy a teljes RNS, valamint a miRNS frakcióra specializált nukleinsav tisztító eljárások milyen hatékonysággal tudnak rövid, nem-kódoló miRNS-eket kinyerni. A miRNS izoláló módszerek elemzése során azt tapasztaltam, hogy a High Pure miRNA izoláló kittel feldolgozott mintákban magasabb volt a kimutatható miRNS-ek száma az Exiqon cég által forgalmazott izoláló kit eredményeihez képest. Vizsgálataim azt mutatták, hogy kevesebb miRNS kifejeződése észlelhető a teljes RNS-t tartalmazó mintákban, mint a kizárólag rövid RNS frakciókat tartalmazókban. Több, a szakirodalom által javasolt referencia miRNS-t megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy kifejeződésük nagy szórással jellemezhető, és olykor nem is fejeződnek ki vastagbél szövetmintákban. Ezért referenciaként egy új, más kutatócsoportok által még nem alkalmazott referencia miRNS-t alkalmaztunk (miR-490-3p), amely a normális és daganatos vastagbél szövetek közt nem mutatott expressziós különbséget. Megfigyeléseim szerint a tumor aktívan kommunikál a környezetével, amely folyamat szerves részét képezik a véráramban keringő miRNS-ek is, A miRNS-ek ezáltal eljuthatnak távoli szövetekbe is, ahol kifejtetik géncsendesítő hatásukat. A keringésben található miRNS-ek további vizsgálata tehát nemcsak diagnosztikai, hanem a tumor és távoli szövetek kommunikációs folyamatának megértése szempontjából is nagy jelentőségű lehet.

8.2. Summary

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs that control posttranscriptional expression of target genes. Changes in the expression of selected miRNAs can provide more information about the progression of colorectal adenoma-carcinoma transition. In my PhD work I have analyzed the miRNA expression changes in tubular and tubulovillous adenoma samples during colorectal cancer progression. MiRNA expression patterns were determined between different patient groups. Moreover, the predicted cyclin D1 mRNA target of miR-497 was proved at the protein level by immunohistochemistry experiments. Matched plasma samples were also investigated and altered miRNA expression profiles were detected in tubular, tubulovillous adenoma and colorectal cancer (CRC) samples compared to normal. According to the microarray and real-time PCR results, upregulation of miR-187, miR-612, miR-1296, miR-933, miR-937, miR-1207 and miR-146a was detected in CRC plasma and matched tissue samples, as well. More than 700 miRNAs were analyzed by real-time PCR in order to compare the samples extracted by different RNA isolation methods. During my experiments I have analyzed the efficiency of total RNA and miRNA purification methods regarding to miRNA content. Based on real-time PCR results, I have found that higher amount of miRNAs could be detected in samples isolated with High Pure miRNA isolation kit compared to samples that were purified by miRCURY RNA isolation kit. I have established that less miRNA could be observed in total RNA samples compared to samples containing only short RNAs. Focusing on reference miRNAs I have analyzed well-known candidates, but none of them were ideal for normalization in colon tissues. Therefore, miR-490-3p was selected as a new potential reference miRNA for downstream analyses of colon tissue samples. The results of my PhD work have demonstrated that tumor cells can communicate with the environment by circulating miRNAs and its gene silencing mechanisms could occur in distant metastatic sites. Further analysis of circulating miRNAs could be important in diagnostic approaches and moreover it also helps us to understand the mechanism of tumor cell communication between other metastatic regions.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H (2012) Identifying the Stem Cell of the Intestinal Crypt: Strategies and Pitfalls. *Cell Stem Cell*, 11 (4):452-460.
2. Chung EAL, Emmanuel AV (2006) Gastrointestinal symptoms related to autonomic dysfunction following spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 152:317-333.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127 (12):2893-2917.
4. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E (2009) Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 59 (6):366-378.
5. Herszenyi L, Tulassay Z (2010) Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14 (4):249-258.
6. Chung SJ, Kim YS, Yang SY, Song JH, Park MJ, Kim JS, Jung HC, Song IS (2010) Prevalence and risk of colorectal adenoma in asymptomatic Koreans aged 40-49 years undergoing screening colonoscopy. *J Gastroen Hepatol*, 25 (3):519-525.
7. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, Ostos LCG, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D (2013) A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*, 19 (5):619-625.
8. Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87 (2):159-170.
9. Kumar V, Robbins SL (2007) Robbins basic pathology. 8th edn. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA
10. Dukes CE (1980) The Classification of Cancer of the Rectum. *Dis Colon Rectum*, 23 (8):605-611.
11. Astler VB, Coller FA (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 139 (6):846-852.
12. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260 (5109):816-819.
13. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411 (6835):366-374.

14. Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36 (6):2251-2270.
15. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61 (5):759-767.
16. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127 (3):469-480.
17. Tulassay Z (2004) A vastagbélrák megelőzése és kezelése. Springer Tudományos Könyvkiadó, Budapest
18. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T (2008) Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet*, 40 (5):600-608.
19. Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, Kranenburg O (2005) Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta*, 1756 (2):103-114.
20. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li FZ, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34(cdc2) phosphorylation of survivin. *P Natl Acad Sci USA*, 97 (24):13103-13107.
21. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N (2001) Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 91 (11):2026-2032.
22. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y (2006) Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*, 41 (3):185-192.
23. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V (2013) The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 62 (3):367-386.
24. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong RC, Cipriano SC, Krepulat F (1999) Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene*, 18 (17):2747-2754.
25. Munro AJ, Lain S, Lane DP (2005) P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*, 92 (3):434-444.
26. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA (2007) Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*, 13 (28):3784-3791.

27. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*, 27 (50):6507-6521.
28. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA (2004) Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*, 20 (4-5):199-206.
29. Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM, Smyrk T, Watson P, Lynch JF, Lynch PM, Cristofaro G, Bufo P, Tauro AV, et al. (1988) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer--Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am*, 17 (4):679-712.
30. Imai K, Yamamoto H (2008) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*, 29 (4):673-680.
31. Eshleman JR, Casey G, Kochera ME, Sedwick WD, Swinler SE, Veigl ML, Willson JKV, Schwartz S, Markowitz SD (1998) Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene*, 17 (6):719-725.
32. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA (2002) Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer*, 38 (7):858-866.
33. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268 (5215):1336-1338.
34. 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):255-257.
35. 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*, 275 (5302):967-969.
36. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M (1997) Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*, 57 (19):4420-4426.
37. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR (1997) Mutations in beta-catenin are uncommon

in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res*, 57 (20):4478-4481.

38. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Metzler 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. *Journal of Clinical Pathology*, 52 (6):455-460.

39. Song LL, Li YM (2016) The Role of Stem Cell DNA Methylation in Colorectal Carcinogenesis. *Stem Cell Rev Rep*, 12 (5):573-583.

40. Lizarbe MA, Calle-Espinosa J, Fernandez-Lizarbe E, Fernandez-Lizarbe S, Robles MA, Olmo N, Turnay J (2017) Colorectal Cancer: From the Genetic Model to Posttranscriptional Regulation by Noncoding RNAs. *Biomed Res Int*, 2017:7354260.

41. Faller M, Guo F (2008) MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochimica et biophysica acta*, 1779 (11):663-667.

42. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM (2006) Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 17 (3):189-202.

43. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9 (2):102-114.

44. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM (2006) Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*, 17 (3):189-202.

45. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432 (7014):235-240.

46. Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG, Dargemont C (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *The Journal of biological chemistry*, 278 (8):5505-5508.

47. Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U (2008) MicroRNAs - micro in size but macro in function. *Febs Journal*, 275 (20):4929-4944.

48. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409 (6818):363-366.

49. Seitz H, Zamore PD (2006) Rethinking the microprocessor. *Cell*, 125 (5):827-829.

50. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic acids research*, 35 (17):5944-5953.
51. Aalto AP, Pasquinelli AE (2012) Small non-coding RNAs mount a silent revolution in gene expression. *Current opinion in cell biology*, 24 (3):333-340.
52. Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *Rna*, 17 (2):312-326.
53. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9 (2):175-179.
54. Podolska A, Kaczkowski B, Litman T, Fredholm M, Cirera S (2011) How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochim Pol*, 58 (4):535-540.
55. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*, 27 (22):4436-4443.
56. Korga A, Wilkolaska K, Korobowicz E (2007) [Difficulties in using archival paraffin-embedded tissues for RNA expression analysis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:151-155.
57. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, Jensen RH (2000) Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*, 2 (2):84-91.
58. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB (2004) Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues - Development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *American Journal of Pathology*, 164 (1):35-42.
59. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for MicroRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10 (3):203-211.
60. Drakulovski P, Locatelli S, Butel C, Pion S, Krasteva D, Mougdi-Pole E, Delaporte E, Peeters M, Mallie M (2013) Use of RNAlater (R) as a preservation method

for parasitic coprology studies in wild-living chimpanzees. *Exp Parasitol*, 135 (2):257-261.

61. Li JH, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O (2007) Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *Bmc Biotechnology*, 7:36.

62. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J (2007) Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, 13 (10):1668-1674.

63. Bovell L, Shanmugam C, Katkoori VR, Zhang B, Vogtmann E, Grizzle WE, Manne U (2012) miRNAs are stable in colorectal cancer archival tissue blocks. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1937-1940.

64. Votavova H, Forsterova K, Stritesky J, Velenska Z, Trneny M (2009) Optimized Protocol for Gene Expression Analysis in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Using Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Diagn Mol Pathol*, 18 (3):176-182.

65. Guo Y, Bosompem A, Zhong X, Clark T, Shyr Y, Kim AS (2014) A comparison of microRNA sequencing reproducibility and noise reduction using mirVana and TRIzol isolation methods. *Int J Comput Biol Drug Des*, 7 (2-3):102-112.

66. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270 (5235):467-470.

67. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G (2009) Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *Plos One*, 4 (5):e5540.

68. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31 (4):e15

69. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (26):9740-9744.

70. Benes V, Castoldi M (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, 50 (4):244-249.

71. Koshkin AA, Nielsen P, Meldgaard M, Rajwanshi VK, Singh SK, Wengel J (1998) LNA (locked nucleic acid): An RNA mimic forming exceedingly stable LNA : LNA duplexes. *J Am Chem Soc*, 120 (50):13252-13253.
72. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang JM, Sarkar A, Yang LQ, Elton TS, Chen CF (2008) Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44 (1):31-38.
73. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K (2015) Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clinical Chemistry*, 61 (11):1333-1342.
74. Hata A, Kashima R (2016) Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51 (3):121-134.
75. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W (2007) MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*, 171 (3):728-738.
76. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27 (15):2128-2136.
77. Yang Y, Yang JJ, Tao H, Jin WS (2015) MicroRNA-21 controls hTERT via PTEN in human colorectal cancer cell proliferation. *J Physiol Biochem*, 71 (1):59-68.
78. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Oh PS, Nautiyal J, Sarkar FH, Majumdar AP (2012) MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFbetaR2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 33 (1):68-76.
79. Tang W, Zhu Y, Gao J, Fu J, Liu C, Liu Y, Song C, Zhu S, Leng Y, Wang G, Chen W, Du P, Huang S, Zhou X, Kang J, Cui L (2014) MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *Brit J Cancer*, 110 (2):450-458.
80. Chen T, Yao LQ, Shi Q, Ren Z, Ye LC, Xu JM, Zhou PH, Zhong YS (2014) MicroRNA-31 contributes to colorectal cancer development by targeting factor inhibiting HIF-1 alpha (FIH-1). *Cancer Biol Ther*, 15 (5):516-523.
81. Sun DF, Yu F, Ma YT, Zhao R, Chen X, Zhu J, Zhang CY, Chen JN, Zhang JF (2013) MicroRNA-31 Activates the RAS Pathway and Functions as an Oncogenic MicroRNA in Human Colorectal Cancer by Repressing RAS p21 GTPase Activating Protein 1 (RASA1). *J Biol Chem*, 288 (13):9508-9518.

- 82 . Xu RS, Wu XD, Zhang SQ, Li CF, Yang L, Li DD, Zhang BG, Zhang Y, Jin JP, Zhang B (2013) The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *Int J Oncol*, 42 (2):676-682.
83. Zhang GJ, Zhou H, Xiao HX, Liu ZL, Tian HP, Zhou T (2014) MicroRNA-92a Functions as an Oncogene in Colorectal Cancer by Targeting PTEN. *Digest Dis Sci*, 59 (1):98-107.
84. Gao F, Wang W (2015) MicroRNA-96 promotes the proliferation of colorectal cancer cells and targets tumor protein p53 inducible nuclear protein 1, forkhead box protein O1 (FOXO1) and FOXO3a. *Mol Med Rep*, 11 (2):1200-1206.
85. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Vrieling JAFO, Bolijn A, Meijer GA, Agami R (2008) Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Research*, 68 (14):5795-5802.
86. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, Adair B, Vannini I, Fanini F, Bottoni A, Costinean S, Sandhu SK, Nuovo GJ, Alder H, Gafa R, Calore F, Ferracin M, Lanza G, Volinia S, Negrini M, McIlhatton MA, Amadori D, Fishel R, Croce CM (2010) Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *P Natl Acad Sci USA*, 107 (15):6982-6987.
87. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell*, 120 (5):635-647.
88. Pekow J, Meckel K, Dougherty U, Butun F, Mustafi R, Lim J, Crofton C, Chen XD, Joseph L, Bissonnette M (2015) Tumor suppressors miR-143 and miR-145 and predicted target proteins API5, ERK5, K-RAS, and IRS-1 are differentially expressed in proximal and distal colon. *Am J Physiol-Gastr L*, 308 (3):G179-G187.
89. Su J, Liang H, Yao W, Wang N, Zhang S, Yan X, Feng H, Pang W, Wang Y, Wang X, Fu Z, Liu Y, Zhao C, Zhang J, Zhang CY, Zen K, Chen X, Wang Y (2014) MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer. *Plos One*, 9 (12):e114420.
90. Yin Y, Yan ZP, Lu NN, Xu Q, He J, Qian X, Yu J, Guan X, Jiang BH, Liu LZ (2013) Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochim Biophys Acta*, 1829 (2):239-247.
91. Wang H, An HY, Wang B, Liao Q, Li WD, Jin XJ, Cui SZ, Zhang YJ, Ding YQ, Zhao L (2013) miR-133a represses tumour growth and metastasis in colorectal

cancer by targeting LIM and SH3 protein 1 and inhibiting the MAPK pathway. *Eur J Cancer*, 49 (18):3924-3935.

92. Croce CM (2008) Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine* 358, (5):502-511.

93. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G (2006) microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *P Natl Acad Sci USA*, 103 (24):9136-9141.

94. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H (2010) Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular cancer*, 9:306.

95. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (24):15524-15529.

96. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1 (12):882-891.

97. Wu XB, Xu XH, Li SL, Wu SB, Chen R, Jiang QP, Liu HB, Sun Y, Li Y, Xu YD (2015) Identification and Validation of Potential Biomarkers for the Detection of Dysregulated microRNA by qPCR in Patients with Colorectal Adenocarcinoma. *Plos One*, 10 (3).

98. Goel A, Boland CR (2012) Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 143 (6):1442- 1460.

99. Gu J, Chen Y, Huang HY, Yin LY, Xie Z, Zhang MQ (2014) Gene module based regulator inference identifying miR-139 as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Biosyst*, 10 (12):3249-3254.

100. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C-Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell*, 75 (5):843-854.

101. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of

the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408 (6808):86-89

102. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294 (5543):853-858.

103. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *P Natl Acad Sci USA*, 99 (24):15524-15529.

104. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39 (Database issue):D152-157.

105. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 64 (11):3753-3756.

106. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *P Natl Acad Sci USA*, 102 (39):13944-13949.

107. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435 (7043):839-843.

108. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T (2006) MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*, 16 (4):845-850.

109. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER (2007) p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*, 17 (15):1298-1307.

110. Huang QH, Gumireddy K, Schrier M, Le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li AP, Huang GH, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Pure E, Agami R (2008) The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*, 10 (2):202-U283.

111. Chen X, Ba Y, Ma LJ, Cai X, Yin Y, Wang KH, Guo JG, Zhang YJ, Chen JN, Guo X, Li QB, Li XY, Wang WJ, Zhang Y, Wang J, Jiang XY, Xiang Y, Xu C, Zheng PP, Zhang JB, Li RQ, Zhang HJ, Shang XB, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang

- JF, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18 (10):997-1006.
112. Bouchie A (2013) First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol*, 31 (7):577-577.
113. Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z (2004) Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nature methods*, 1 (2):155-161.
114. Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56 (11):1733-1741.
115. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*, 31 (6):659-666.
116. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one*, 3 (11):e3694.
117. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H (2010) Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*, 9:306.
118. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39 (16):7223-7233.
119. Luo X, Burwinkel B, Tao S, Brenner H (2011) MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20 (7):1272-1286.
120. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 11 (6):426-437.
121. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ (2009) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58 (10):1375-1381.
122. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X (2010) Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 127 (1):118-126.

123. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N (2014) Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *Plos One*, 9 (4).
124. Ng EKO, Chong WWS, Jin H, Lam EKY, Shin VY, Yu J, Poon TCW, Ng SSM, Sung JY (2009) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58 (10):1375-1381.
125. Slattery ML, Herrick JS, Pellatt DF, Stevens JR, Mullany LE, Wolff E, Hoffman MD, Samowitz WS, Wolff RK (2016) MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression. *Carcinogenesis*, 37 (3):245-261.
126. Leidinger P, Galata V, Backes C, Stahler C, Rheinheimer S, Huwer H, Meese E, Keller A (2015) Longitudinal study on circulating miRNAs in patients after lung cancer resection. *Oncotarget*, 6 (18):16674-16685.
127. Vishnubalaji R, Hamam R, Abdulla MH, Mohammed MAV, Kassem M, Al-Obeed O, Aldahmash A, Alajez NM (2015) Genome-wide mRNA and miRNA expression profiling reveal multiple regulatory networks in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 6 (1): e1614.
128. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DLW, Au GKH, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC (2008) MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama-J Am Med Assoc*, 299 (4):425-436.
129. Gattolliat CH, Uguen A, Pesson M, Trillet K, Simon B, Doucet L, Robaszekiewicz M, Corcos L (2015) MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Eur J Cancer*, 51 (3):409-420.
130. Estal RM, Suela SP, Jimenez ID, Gonzalez CA, Rojas CE, Garcia-Casado Z, Guerrero JAL, Fita MJJ, Heras ABS, Huerta AS, Bertran AS, Gonzalez IC, Garcia ML, Simo GP, Gonzalez EB, Gilabert PB (2016) Relationship of immunohistochemistry, copy number aberrations and epigenetic disorders with BRCAness pattern in hereditary and sporadic breast cancer. *Fam Cancer*, 15 (2):193-200.
131. Chang KH, Miller N, Kheirleisid EAH, Lemetre C, Ball GR, Smith MJ, Regan M, McAnena OJ, Kerin MJ (2011) MicroRNA signature analysis in colorectal cancer:

identification of expression profiles in stage II tumors associated with aggressive disease. *Int J Colorectal Dis*, 26 (11):1415-1422.

132. Zhang GJ, Zhou H, Xiao HX, Li Y, Zhou T (2014) MiR-378 is an independent prognostic factor and inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Bmc Cancer*, 14:109.

133. Tanoglu A, Balta AZ, Berber U, Ozdemir Y, Emirzeoglu L, Sayilir A, Sucullu I (2015) MicroRNA expression profile in patients with stage II colorectal cancer: a Turkish referral center study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (5):1851-1855.

134. Zheng KY, Liu WC, Liu Y, Jiang CQ, Qian Q (2015) MicroRNA-133a suppresses colorectal cancer cell invasion by targeting Fascin1. *Oncol Lett*, 9 (2):869-874.

135. Wang LL, Du LT, Li J, Liu YM, Qu AL, Yang YM, Zhang X, Zheng GX, Wang CX (2014) Decreased expression of miR-133a correlates with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroentero*, 20 (32):11340-11346.

136. Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, Radova L, Fabian P, Slaba K, Kiss I, Vyzula R, Slaby O (2012) Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*, 16 (11):2655-2666.

137. Navickas R, Gal D, Laucevicius A, Taparauskaite A, Zdanyte M, Holvoet P (2016) Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*, 111 (4):322-337.

138. Liu XH, Wang J, Dong YH (2018) The inhibitory effect of miR-375 targeting sp1 in colorectal cancer cell proliferation. *Eur Rev Med Pharmacol*, 22 (2):405-411.

139. Tang S, Wu WK, Li X, Wong SH, Wong N, Chan MT, Sung JJ, Yu J (2016) Stratification of Digestive Cancers with Different Pathological Features and Survival Outcomes by MicroRNA Expression. *Sci Rep*, 6:24466.

140. Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Pattabiraman DR, Nones K, Waddell N, Mariasegaram M, Simpson PT, Lakhani SR, Vlassov A, Grimmond SM, Cloonan N (2013) miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 19 (12):1767-1780.

141. Tao K, Yang J, Guo Z, Hu Y, Sheng H, Gao H, Yu H (2014) Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer. *Am J Transl Res*, 6 (4):391-401.

142. Liu H, Song Z, Liao D, Zhang T, Liu F, Zheng W, Luo K, Yang L (2015) miR-503 inhibits cell proliferation and invasion in glioma by targeting L1CAM. *Int J Clin Exp Med*, 8 (10):18441-18447.
143. Chang SW, Yue J, Wang BC, Zhang XL (2015) miR-503 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting E2F3. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (10):12853-12860.
144. Humphreys KJ, McKinnon RA, Michael MZ (2014) miR-18a Inhibits CDC42 and Plays a Tumour Suppressor Role in Colorectal Cancer Cells. *Plos One*, 9 (11):e112288.
145. Kanaan Z, Roberts H, Eichenberger MR, Billeter A, Ocheretner G, Pan JM, Rai SN, Jorden J, Williford A, Galandiuk S (2013) A Plasma MicroRNA Panel for Detection of Colorectal Adenomas A Step Toward More Precise Screening for Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, 258 (3):400-408.
146. Azizian A, Kramer F, Jo P, Wolff HA, Beissbarth T, Skarupke R, Bernhardt M, Grade M, Ghadimi BM, Gaedcke J (2015) Preoperative Prediction of Lymph Node Status by Circulating Mir-18b and Mir-20a During Chemoradiotherapy in Patients with Rectal Cancer. *World J Surg*, 39 (9):2329-2335.
147. Sayagues JM, Corchete LA, Gutierrez ML, Sarasquete ME, Abad MD, Bengoechea O, Ferminan E, Anduaga MF, del Carmen S, Iglesias M, Esteban C, Angoso M, Alcazar JA, Garcia J, Orfao A, Munoz-Bellvis L (2016) Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 7 (45):72908-72922.
148. Wang X, Chen L, Jin H, Wang S, Zhang Y, Tang X, Tang G (2016) Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population. *Onco Targets Ther*, 9:1159-1166.
149. Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, Biasiolo M, Faccioli A, Perilli L, Rossi E, Esposito G, Rugge M, Pilati P, Mocellin S, Nitti D, Bortoluzzi S, Zanovello P (2013) Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis. *Bmc Genomics*, 14:589.
150. Perilli L, Vicentini C, Agostini M, Pizzini S, Pizzi M, D'Angelo E, Bortoluzzi S, Mandruzzato S, Mammano E, Rugge M, Nitti D, Scarpa A, Fassan M, Zanovello P (2014) Circulating miR-182 is a biomarker of colorectal adenocarcinoma progression. *Oncotarget*, 5 (16):6611-6619.

151. Xu F, Zhang H, Su Y, Kong J, Yu H, Qian B (2014) Up-regulation of microRNA-183-3p is a potent prognostic marker for lung adenocarcinoma of female non-smokers. *Clin Transl Oncol*, 16 (11):980-985.
152. Yang SB, Krug SM, Heitmann J, Hu L, Reinhold AK, Sauer S, Bosten J, Sommer C, Fromm M, Brack A, Rittner HL (2016) Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier. *Biomaterials*, 82:20-33.
153. Saud SM, Li WD, Morris NL, Matter MS, Colburn NH, Kim YS, Young MR (2014) Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*, 35 (12):2778-2786.
154. Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Levy M, Vodicka P, Neary P, Dowling P, Clynes M (2015) Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression. *Bmc Cancer*, 15.
155. Aslam MI, Venkatesh J, Jameson JS, West K, Pringle JH, Singh B (2015) Identification of high-risk Dukes B colorectal cancer by microRNA expression profiling: a preliminary study. *Colorectal Dis*, 17 (7):578-588.
156. Cao W, Wei W, Zhan Z, Xie D, Xie Y, Xiao Q (2017) Role of miR-647 in human gastric cancer suppression. *Oncol Rep*, 37 (3):1401-1411.
157. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S (2010) Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection. *Cancer Research*, 70 (1):36-45.
158. Kim YW, Kim EY, Jeon D, Liu JL, Kim HS, Choi JW, Ahn WS (2014) Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Des Dev Ther*, 8:293-314.
159. Jeong JH, Park SJ, Dickinson SI, Luo JL (2017) A Constitutive Intrinsic Inflammatory Signaling Circuit Composed of miR-196b, Meis2, PPP3CC, and p65 Drives Prostate Cancer Castration Resistance. *Mol Cell*, 65 (1):154-167.
160. Zhang HH, Gu GL, Zhang XY, Li FZ, Ding L, Fan Q, Wu R, Shi W, Wang XY, Chen L, Wei XM, Yuan XY (2015) Primary analysis and screening of microRNAs in gastric cancer side population cells. *World J Gastroenterol*, 21 (12):3519-3526.
161. Schopman NC, Heynen S, Haasnoot J, Berkhout B (2010) A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA. *RNA Biol*, 7 (5):573-576.

162. Nonaka R, Miyake Y, Hata T, Kagawa Y, Kato T, Osawa H, Nishimura J, Ikenaga M, Murata K, Uemura M, Okuzaki D, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M (2015) Circulating miR-103 and miR-720 as novel serum biomarkers for patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*, 47 (3):1097-1102.
163. Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, Sakurai D, Horiguchi S, Okamoto Y, Seki N (2010) miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). *Brit J Cancer*, 103 (6):877-884.
164. Jiang L, He D, Yang D, Chen Z, Pan Q, Mao A, Cai Y, Li X, Xing H, Shi M, Chen Y, Bruce IC, Wang T, Jin L, Qi X, Hua D, Jin J, Ma X (2014) MiR-489 regulates chemoresistance in breast cancer via epithelial mesenchymal transition pathway. *FEBS Lett*, 588 (11):2009-2015.
165. Wang FF, Zhang XJ, Yan YR, Zhu XH, Yu J, Ding Y, Hu JL, Zhou WJ, Zeng ZC, Liao WT, Ding YQ, Liang L (2017) FBX8 is a metastasis suppressor downstream of miR-223 and targeting mTOR for degradation in colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 388:85-95.
166. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY, Sun XF (2009) Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*, 26 (1):27-34.
167. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R (2007) Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology-Basel*, 72 (5-6):397-402.
168. Hernandez D, Janmohamed A, Chandan P, Phillips IR, Shephard EA (2004) Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene clusters. *Pharmacogenetics*, 14 (2):117-130.
169. Kalmar A, Peterfia B, Hollosi P, Galamb O, Spisak S, Wichmann B, Bodor A, Toth K, Patai AV, Valcz G, Nagy ZB, Kubak V, Tulassay Z, Kovalszky I, Molnar B (2015) DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *Bmc Cancer*, 15:736.
170. Zhang N, Shen Q, Zhang P (2016) miR-497 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer cells by targeting fos-related antigen-1. *Onco Targets Ther*, 9:6597-6604.

171. Li W, Jin X, Deng X, Zhang G, Zhang B, Ma L (2014) The putative tumor suppressor microRNA-497 modulates gastric cancer cell proliferation and invasion by repressing eIF4E. *Biochem Biophys Res Commun*, 449 (2):235-240.
172. Du ML, Shi DN, Yuan L, Li PC, Chu HY, Qin C, Yin CJ, Zhang ZD, Wang ML (2015) Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer. *Sci Rep-Uk*, 5:10437.
173. Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge YY, Yun JP, Zhuang SM (2009) MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 50 (1):113-121.
174. Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, Christgen H, Schipper E, Hille U, Kreipe HH, Langer F (2010) Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer. *Bmc Cancer*, 10:109.
175. Tarasov VA, Matishov DG, Shin EF, Boiko NV, Timoshkina NN, Makhotkin MA, Lomonosov AM, Kirpii AA, Kit OI, Maksimov AY (2014) [Coordinated aberrant expression of miRNAs in colon cancer]. *Genetika*, 50 (10):1232-1244
176. Li D, Zhao Y, Liu C, Chen X, Qi Y, Jiang Y, Zou C, Zhang X, Liu S, Wang X, Zhao D, Sun Q, Zeng Z, Dress A, Lin MC, Kung HF, Rui H, Liu LZ, Mao F, Jiang BH, Lai L (2011) Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17 (7):1722-1730.
177. Hui W, Yuntao L, Lun L, WenSheng L, ChaoFeng L, HaiYong H, Yueyang B (2013) MicroRNA-195 inhibits the proliferation of human glioma cells by directly targeting cyclin D1 and cyclin E1. *Plos One*, 8 (1):e54932.
178. Han K, Chen X, Bian N, Ma B, Yang T, Cai C, Fan Q, Zhou Y, Zhao TB (2015) MicroRNA profiling identifies MiR-195 suppresses osteosarcoma cell metastasis by targeting CCND1. *Oncotarget*, 6 (11):8875-8889.
179. Ma R, Jiang T, Kang X (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res*, 31:38.
180. Sheng L, He P, Yang X, Zhou M, Feng Q (2015) miR-612 negatively regulates colorectal cancer growth and metastasis by targeting AKT2. *Cell Death Dis*, 6 (7): e1808.
181. Bhajun R, Guyon L, Pitaval A, Sulpice E, Combe S, Obeid P, Haguet V, Ghorbel I, Lajaunie C, Gidrol X (2015) A statistically inferred microRNA network identifies breast cancer target miR-940 as an actin cytoskeleton regulator. *Sci Rep*, 5:8336.

182. Bobowicz M, Skrzypski M, Czapiewski P, Marczyk M, Maciejewska A, Jankowski M, Szulgo-Paczkowska A, Zegarski W, Pawlowski R, Polanska J, Biernat W, Jaskiewicz J, Jassem J (2016) Prognostic value of 5-microRNA based signature in T2-T3N0 colon cancer. *Clin Exp Metastasis*, 33 (8):765-773.
183. Cakmak HA, Coskunpinar E, Ikitimur B, Barman HA, Karadag B, Tiryakioglu NO, Kahraman K, Vural VA (2015) The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 16 (6):431-437.
184. Shan X, Wen W, Zhu DX, Yan T, Cheng WF, Huang ZB, Zhang L, Zhang H, Wang TS, Zhu W, Zhu YC, Zhu J (2017) miR 1296-5p Inhibits the Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Repressing ERBB2 Expression. *Plos One*, 12 (1).
185. Wei WJ, Wang YL, Li DS, Wang Y, Wang XF, Zhu YX, Pan XD, Wang ZY, Wu Y, Jin L, Wang JC, Ji QH (2015) Association study of single nucleotide polymorphisms in mature microRNAs and the risk of thyroid tumor in a Chinese population. *Endocrine*, 49 (2):436-444.
186. Dong G, Zhang RF, Xu JJ, Guo YF (2015) Association between microRNA polymorphisms and papillary thyroid cancer susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (10):13450-13457
187. Polisenio L, Haimovic A, Segura MF, Hanniford D, Christos PJ, Darvishian F, Wang JH, Shapiro RL, Pavlick AC, Berman RS, Hernando E, Zavadil J, Osman I (2012) Histology-Specific MicroRNA Alterations in Melanoma. *J Invest Dermatol*, 132 (7):1860-1868.
188. Zhang L, Zeng DX, Chen Y, Li N, Lv YT, Li Y, Xu X, Xu GP (2016) miR-937 contributes to the lung cancer cell proliferation by targeting INPP4B. *Life Sci*, 155:110-115.
189. Zhou N, Zhou Y, Tang Y, Yu W (2016) [MiR-519 inhibits gastric cancer cell activity through regulation of HuR expression]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 41 (1):19-23.
190. Tambyah PA, Sepramaniam S, Mohamed Ali J, Chai SC, Swaminathan P, Armugam A, Jeyaseelan K (2013) microRNAs in circulation are altered in response to influenza A virus infection in humans. *Plos One*, 8 (10):e76811.
191. Li Y, Liang M, Zhang Z (2014) Regression analysis of combined gene expression regulation in acute myeloid leukemia. *PLoS Comput Biol*, 10 (10):e1003908.

192. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Valeri N, Stevens J, Caan BJ, Samowitz W, Wolff RK (2015) An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *Int J Cancer*, 137 (2):428-438.
193. Wang W, Sun J, Li F, Li R, Gu Y, Liu C, Yang P, Zhu M, Chen L, Tian W, Zhou H, Mao Y, Zhang L, Jiang J, Wu C, Hua D, Chen W, Lu B, Ju J, Zhang X (2012) A frequent somatic mutation in CD274 3'-UTR leads to protein over-expression in gastric cancer by disrupting miR-570 binding. *Hum Mutat*, 33 (3):480-484.
194. Barsotti AM, Beckerman R, Laptenko O, Huppi K, Caplen NJ, Prives C (2012) p53-dependent Induction of PVT1 and miR-1204. *J Biol Chem*, 287 (4):2509-2519.
195. Ma YH, Pan XY, Xu PQ, Mi YJ, Wang WY, Wu XT, He Q, Liu XL, Tang WW, An HX (2017) Plasma microRNA alterations between EGFR-activating mutational NSCLC patients with and without primary resistance to TKI. *Oncotarget*, 8 (51):88529-88536.
196. Ju LX, Han MQ, Li XF, Zhao C (2017) MicroRNA Signature of Lung Adenocarcinoma with EGFR Exon 19 Deletion. *J Cancer*, 8 (7):1311-1318.
197. Ding L, Ai D, Wu R, Zhang T, Jing L, Lu J, Zhong L (2016) Identification of the differential expression of serum microRNA in type 2 diabetes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 80 (3):461-465.
198. Zhang YJ, Tang WX, Peng L, Tang JQ, Yuan ZK (2016) Identification and validation of microRNAs as endogenous controls for quantitative polymerase chain reaction in plasma for stable coronary artery disease. *Cardiol J*, 23 (6):694-703.
199. Takahashi I, Hama Y, Matsushima M, Hirotani M, Kano T, Hohzen H, Yabe I, Utsumi J, Sasaki H (2015) Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Brain*, 8:67.
200. Burnum JF (1982) Diagnosis of Depression in a General Medical-Practice - Observations on Lack of Pizzazz, the Blahs, and Other Complaints. *Postgrad Med*, 72 (3):71.
201. Pellatt DF, Stevens JR, Wolff RK, Mullany LE, Herrick JS, Samowitz W, Slattery ML (2016) Expression Profiles of miRNA Subsets Distinguish Human Colorectal Carcinoma and Normal Colonic Mucosa. *Clin Transl Gastroen*, 7.(3): e152.
202. Khare D, Goldschmidt N, Bardugo A, Gur-Wahnon D, Ben-Dov IZ, Avni B (2017) Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance. *Plos One*, 12 (11):e0187722

203. Yan SF, Zhang H, Xie WY, Meng FG, Zhang K, Jiang Y, Zhang X, Zhang JG (2017) Altered microRNA profiles in plasma exosomes from mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Oncotarget*, 8 (3):4136-4146.
204. Xu M, Kuang Y, Wang M, Han X, Yang Q (2017) A microRNA expression signature as a predictor of survival for colon adenocarcinoma. *Neoplasma*, 64 (1):56-64.
205. He HW, Wang NN, Yi XM, Tang CP, Wang D (2018) Low-level serum miR-24-2 is associated with the progression of colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 21 (2):261-267.
206. Wang ZS, Zhong M, Bian YH, Mu YF, Qin SL, Yu MH, Qin J (2016) MicroRNA-187 inhibits tumor growth and invasion by directly targeting CD276 in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7 (28):44266-44276.
207. Liu HS, Zhu L, Liu BY, Yang L, Meng XX, Zhang W, Ma YY, Xiao HS (2012) Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. *Cancer Lett*, 316 (2):196-203.
208. Lin SC, Kao SY, Chang JCY, Liu YC, Yu EH, Tseng SH, Liu CJ, Chang KW (2016) Up-regulation of miR-187 modulates the advances of oral carcinoma by targeting BARX2 tumor suppressor. *Oncotarget*, 7 (38):61355-61365.
209. Tsang WP, Ng EKO, Ng SSM, Jin HC, Yu J, Sung JJY, Kwok TT (2010) Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31 (3):350-358.
210. Heyn H, Schreek S, Buurman R, Focken T, Schlegelberger B, Beger C (2012) MicroRNA miR-548d Is a Superior Regulator in Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 41 (2):218-221.
211. Song Q, Song JQ, Wang QM, Ma YL, Sun N, Ma JY, Chen Q, Xia GS, Huo YP, Yang LQ, Li BL (2016) miR-548d-3p/TP53BP2 axis regulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Med-Us*, 5 (2):315-324.
212. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, Caffarel MM, Araujo AM, Araiz M, Fernandez-Mercado M, Lawrie CH (2016) New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci* 17 (5): 627.
213. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N (2009) Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clinical Chemistry*, 55 (11):1944-1949.

214. Igaz I, Igaz P (2015) Why is microRNA action tissue specific? A putative defense mechanism against growth disorders, tumor development or progression mediated by circulating microRNA? *Med Hypotheses*, 85 (5):530-533.
215. Kotorashvili A, Ramnauth A, Liu C, Lin J, Ye K, Kim R, Hazan R, Rohan T, Fineberg S, Loudig O (2012) Effective DNA/RNA Co-Extraction for Analysis of MicroRNAs, mRNAs, and Genomic DNA from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens. *Plos One*, 7 (4).
216. Liu A, Xu X (2011) MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*, 724:259-267.
217. de Carvalho AC, Scapulatempo-Neto C, Maia DCC, Evangelista AF, Morini MA, Carvalho AL, Vettore AL (2015) Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Bmc Med*, 13. (13):108.
218. Tetzlaff MT, Liu A, Xu XW, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, Livolsi VA, Baloch ZW (2007) Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol*, 18 (3):163-173.
219. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CML (2012) Enhanced Stability of MicroRNA Expression Facilitates Classification of FFPE Tumour Samples Exhibiting Near Total mRNA Degradation. *J Pathol*, 228:S15-S15.
220. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordóñez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF (2010) Comprehensive MicroRNA Profiling for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 16 (4):1129-1139.
221. Treece AL, Duncan DL, Tang WH, Elmore S, Morgan DR, Dominguez RL, Speck O, Meyers MO, Gulley ML (2016) Gastric adenocarcinoma microRNA profiles in fixed tissue and in plasma reveal cancer-associated and Epstein-Barr virus-related expression patterns. *Lab Invest*, 96 (6):661-671.
222. Boisen MK, Dehlendorff C, Linnemann D, Schultz NA, Jensen BV, Hogdall EVS, Johansen JS (2015) MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability. *Bmc Cancer*, 15:1024.

223. Buitrago DH, Patnaik SK, Kadota K, Kannisto E, Jones DR, Adusumilli PS (2015) Small RNA sequencing for profiling microRNAs in long-term preserved formalin-fixed and paraffin-embedded non-small cell lung cancer tumor specimens. *Plos One*, 10 (3):e0121521.
224. El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, Bernardin F, Berchem G (2016) Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep-Uk*, 6:19529.
225. Ach RA, Wang H, Curry B (2008) Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol*, 8:69.
226. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, Jung K (2010) Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem*, 56 (6):998-1006.
227. Camps C, Saini HK, Mole DR, Choudhry H, Reczko M, Guerra-Assuncao JA, Tian YM, Buffa FM, Harris AL, Hatzigeorgiou AG, Enright AJ, Ragoussis J (2014) Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol Cancer*, 13:28.
228. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY (2007) MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Research*, 67 (18):8433-8438.
229. Peltier HJ, Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 14 (5):844-852.
230. Banyard J, Chung I, Wilson AM, Vetter G, Le Behec A, Bielenberg DR, Zetter BR (2013) Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Sci Rep-Uk*, 3: 3151.
231. Pasqualini L, Bu H, Puhr M, Narisu N, Rainer J, Schlick B, Schafer G, Angelova M, Trajanoski Z, Borno ST, Schweiger MR, Fuchsberger C, Klocker H (2015) miR-22 and miR-29a Are Members of the Androgen Receptor Cistrome Modulating LAMC1 and Mcl-1 in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol*, 29 (7):1037-1054.

232. Ellis-Connell AL, Iempridee T, Xu I, Mertz JE (2010) Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication. *J Virol*, 84 (19):10329-10343.
233. Ulivi P, Foschi G, Mengozzi M, Scarpi E, Silvestrini R, Amadori D, Zoli W (2013) Peripheral Blood miR-328 Expression as a Potential Biomarker for the Early Diagnosis of NSCLC. *Int J Mol Sci*, 14 (5):10332-10342.
234. Gao J, Li N, Dong Y, Li S, Xu L, Li X, Li Y, Li Z, Ng SS, Sung JJ, Shen L, Yu J (2015) miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. *Oncogene* 34, (31):4142-4152.
235. Wang T, Xu HH, Liu XL, Chen S, Zhou Y, Zhang XP (2017) Identification of Key Genes in Colorectal Cancer Regulated by miR-34a. *Med Sci Monitor* 23:5735-5743.
236. Hermeking H (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*, 17 (2):193-199.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények**

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmar A, Bartak BK, Tulassay Z, Molnar B (2016) miRNA Isolation from FFPET Specimen: A Technical Comparison of miRNA and Total RNA Isolation Methods. *Pathol Oncol Res* 22 (3):505-513. doi:10.1007/s12253-015-0027-4 **IF:1,736**

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmar A, Galamb O, Bartak BK, Spisak S, Tulassay Z, Molnar B (2017) Colorectal adenoma and carcinoma specific miRNA profiles in biopsy and their expression in plasma specimens. *Clin Epigenetics* 9:22. doi:10.1186/s13148-016-0305-3 **IF: 4,987**

Nagy ZB, Bartak BK, Kalmar A, Galamb O, Wichmann B, Dank M, Igaz P, Tulassay Z, Molnar B (2017) Comparison of Circulating miRNAs Expression Alterations in Matched Tissue and Plasma Samples During Colorectal Cancer Progression. *Pathol Oncol Res.* doi:10.1007/s12253-017-0308-1 **IF: 1,736**

10.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Nagy ZB, Bartak BK, Molnar B, Spisak S, Tulassay Zs (2012) A keringő és szöveti microRNS-ek szerepe és kimutatásuk lehetőségei daganatos megbetegedésekben. *Magyar Belorvosi Archivum* 65 (3) pp. 157-164 **IF:0**

Kalmar A, Peterfia B, Hollosi P, Galamb O, Spisak S, Wichmann B, Bodor A, Toth K, Patai AV, Valcz G, **Nagy ZB**, Kubak V, Tulassay Z, Kovalszky I, Molnar B (2015) DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BMC Cancer* 15:736. doi:10.1186/s12885-015-1687-x **IF:3,265**

Kalmar A, Peterfia B, Wichmann B, Patai AV, Bartak BK, **Nagy ZB**, Furi I, Tulassay Z, Molnar B (2015) Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods for DNA Methylation Analysis of Biopsy, Fresh Frozen, and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Colorectal Cancer Samples. *J Lab Autom* 20 (6):642-651. doi:10.1177/2211068214565903 **IF:1,297**

Bartak BK, Kalmar A, Peterfia B, Patai AV, Galamb O, Valcz G, Spisak S, Wichmann B, **Nagy ZB**, Toth K, Tulassay Z, Igaz P, Molnar B (2017) Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics* 12 (9):751-763. doi:10.1080/15592294.2017.1356957 **IF: 4,394**

Toth K, Patai AV, Kalmar A, Bartak BK, **Nagy ZB**, Galamb O, Wichmann B, Tulassay Z, Molnar B (2017) Circadian Rhythm of Methylated Septin 9, Cell-Free DNA Amount and Tumor Markers in Colorectal Cancer Patients. *Pathol Oncol Res* 23 (3):699-706. doi:10.1007/s12253-016-0174-2 **IF:1,736**

Bartak BK, Kalmar A, Galamb O, Wichmann B, **Nagy ZB**, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnar B (2018) Blood Collection and Cell-Free DNA Isolation Methods Influence the Sensitivity of Liquid Biopsy Analysis for Colorectal Cancer Detection. *Pathol Oncol Res*. doi:10.1007/s12253-018-0382-z **IF:1,736**

Barták BK, **Nagy ZB**, Molnár B, Spisák S, Tulassay Zs (2012) A sejten kívüli szabad DNS, mint lehetséges jelátviteli molekula molekuláris és funkcionális vizsgálatainak áttekintése. *Magyar Belorvosi Archivum* 65 (3)pp. 148-156 **IF:0**

Szigeti KA, Galamb O, Kalmar A, Bartak BK, **Nagy ZB**, Markus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnar B (2018) [Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer]. *Orv Hetil* 159 (1):3-15. doi:10.1556/650.2018.30927 **IF:0,349**

Bartak BK, **Nagy ZB**, Spisak S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnar B (2018) [In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation]. *Orv Hetil* 159 (6):223-233. doi:10.1556/650.2018.30929 **IF: 0,349**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

-programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanár, akadémikusnak, a II.sz Belgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi igazgatóinak, † Prof. Dr. Rácz Károlynak és Prof. Dr. Igaz Péternek, hogy támogatták munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinikáján;

-témavezetőmnek Dr. Molnár Bélának, hogy PhD éveim alatt egy korszerűen felszerelt laboratóriumban dolgozhattam, irányítása alatt a tudományos kutatópályámon elindulhattam és rengeteg tapasztalatot szerezhettem;

-házi opponenseimnek Dr. Patócs Attila egyetemi docensnek és Dr. Hagymási Krisztina egyetemi adjunktusnak;

-Dr. Spisák Sándornak, első mentoromnak, aki bevezetett a molekuláris biológia gyakorlati világába, és akitől elsajátíthattam a megfelelő kutatói szemléletmódot;

-Dr. Kalmár Alexandrának és Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának a szakmai tanácsaikat, segítő útmutatásaikat, építő szándékú kritikáikat, bírálataikat, melyek mindig jó alkalmat adtak ahhoz, hogy a disszertációm tovább épülhessen;

-Molnár Barbarának, barátnőmnek és munkatársamnak, akivel az egyetem első napja óta együtt építjük kutatói szemléletünket;

-Dr. Wichmann Barnabásnak és Dr. Valcz Gábornak a bioinformatikai elemzésekért és az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségükért;

-Könyáné Farkas Gabriellának, Tóth Bernadettnek és Kovács Hajnalkának asszisztensi munkájukért;

-Molekuláris Gasztroenterológiai Laboratórium munkatársainak: Dr. Tóth Kingának, Dr. Leiszter Katalinnak, Dr. Patai Árpádnak, Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Schöller Andreának, Dr. Fűri Istvánnak, Dr. Zsigrai Sárának, Szigeti Krisztinának, Márkus Eszternek;

-Berczik Máriának minden adminisztratív feladat megoldásában nyújtott segítségéért;

-a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópia Osztályán dolgozó összes munkatársának, akik segítettek a mintagyűjtést.

-és nem utolsó sorban családom kitartó támogatását és buzdítását.

12. FÜGGELÉK

1. **Táblázat.** A megváltozott kifejeződést mutató miRNS-ek listája egészséges és vastagbélrákos szövetminták összehasonlítását követően az alábbi feltételek érvényesülése mellett: $p < 0,05$; $\log_2 FC > |1|$

miRNS azonosító	Egészséges vs. CRC	
	p érték	Log ₂ FC
hsa-miR-31	8,6E-07	-3,02
hsa-miR-4417	1,6E-07	-2,45
hsa-miR-503	3,2E-09	-2,23
hsa-miR-3647-5p	2,4E-04	-1,67
hsa-miR-18a	2,3E-07	-1,64
hsa-miR-4730	2,2E-04	-1,58
hsa-miR-223	4,8E-04	-1,42
hsa-miR-424*	3,6E-07	-1,40
hsa-miR-27a*	4,2E-07	-1,39
hsa-miR-29b-1*	2,2E-05	-1,39
hsa-miR-431	3,1E-07	-1,39
hsa-miR-183*	1,4E-05	-1,36
hsa-miR-224	9,8E-07	-1,34
hsa-miR-3687	5,2E-04	-1,33
hsa-miR-1246	2,8E-04	-1,30
hsa-miR-21*	1,1E-06	-1,26
hsa-miR-182	4,3E-05	-1,23
hsa-miR-106b*	5,7E-07	-1,19
hsa-miR-4734	7,3E-04	-1,19
hsa-miR-3613-3p	2,8E-03	-1,18
hsa-miR-18b	1,0E-05	-1,17
hsa-miR-3663-3p	1,2E-03	-1,17
hsa-miR-4446-5p	2,2E-02	-1,14
hsa-miR-3185	2,0E-03	-1,12
hsa-miR-34b	2,1E-03	-1,12
hsa-miR-584	6,1E-05	-1,11
hsa-miR-31*	1,1E-03	-1,10
hsa-miR-20b	4,5E-06	-1,09
hsa-miR-20a	5,0E-07	-1,08
hsa-miR-4674	8,2E-04	-1,08
hsa-miR-4741	7,4E-04	-1,08
hsa-miR-106a	9,8E-07	-1,06
hsa-miR-17	1,1E-06	-1,05
hsa-miR-4668-5p	1,7E-03	-1,05
hsa-miR-4640-5p	1,5E-04	-1,04
hsa-miR-23a*	4,7E-06	-1,04

hsa-miR-708	5,8E-03	-1,03
hsa-miR-3178	6,0E-04	-1,01
hsa-miR-493	5,8E-06	-1,01
hsa-miR-3591-3p	5,6E-03	-1,01
hsa-miR-145	1,5E-04	1,01
hsa-miR-138	3,4E-03	1,02
hsa-miR-10a*	2,9E-03	1,02
hsa-miR-154	9,2E-04	1,05
hsa-miR-149	3,8E-04	1,07
hsa-miR-299-5p	4,4E-03	1,08
hsa-miR-10a	4,9E-05	1,09
hsa-miR-30e*	1,5E-07	1,10
hsa-miR-4645-5p	4,9E-06	1,10
hsa-miR-376c	8,2E-03	1,13
hsa-miR-664*	1,7E-06	1,19
hsa-miR-29c*	1,7E-04	1,26
hsa-miR-192*	1,3E-04	1,27
hsa-miR-1	1,1E-04	1,28
hsa-miR-147b	5,4E-07	1,30
hsa-miR-342-5p	1,8E-05	1,31
hsa-miR-497	6,1E-06	1,33
hsa-miR-378	3,3E-07	1,35
hsa-miR-195	1,3E-06	1,38
hsa-miR-194*	3,2E-05	1,44
hsa-miR-378c	2,9E-07	1,47
hsa-miR-378g	2,6E-08	1,52
hsa-miR-378*	3,6E-08	1,53
hsa-miR-30a*	3,9E-06	1,54
hsa-miR-378f	1,3E-07	1,55
hsa-miR-378d	2,6E-08	1,56
hsa-miR-196b	1,5E-04	1,57
hsa-miR-378i	1,2E-07	1,58
hsa-miR-378e	8,4E-07	1,58
hsa-miR-10b*	2,8E-09	1,65
hsa-miR-422a	1,6E-07	1,66
hsa-miR-150	7,6E-09	1,67
hsa-miR-196a	8,0E-04	1,70
hsa-miR-133b	5,8E-08	1,80
hsa-miR-10b	1,2E-08	1,90
hsa-miR-139-5p	1,0E-09	1,95
hsa-miR-215	1,6E-05	2,08
hsa-miR-133a	9,8E-08	2,17
hsa-miR-375	4,2E-05	2,21

2. **Táblázat.** A megváltozott kifejeződést mutató miRNS-ek listája tubuláris adenóma és tubulovillózus adenóma szövetminták összehasonlítását követően az alábbi feltételek érvényesülése mellett: $p < 0,05$; $\log_2 FC > |1|$. Rövidítések: ADT- tubuláris adenóma; ADTV- tubulovillózus adenóma.

miRNS azonosító	ADT vs. ADTV	
	p érték	Log ₂ FC
hsa-miR-489	3,0E-03	-2,26
hsa-miR-183	1,0E-02	-1,58
hsa-miR-374b	9,3E-03	-1,22
hsa-miR-335	2,0E-03	-1,18
hsa-miR-338-5p	5,1E-03	-1,16
hsa-miR-96	1,2E-02	-1,15
hsa-miR-552	1,4E-02	-1,13
hsa-miR-138-1*	3,2E-02	-1,08
hsa-miR-183*	1,5E-02	-1,08
hsa-miR-3175	5,6E-03	1,38
hsa-miR-720	2,6E-02	1,37
hsa-miR-4492	1,9E-02	1,10
hsa-miR-4508	2,1E-02	1,02

3. **Táblázat.** A megváltozott kifejeződést mutató miRNS-ek listája egészséges és adenóma szövetminták összehasonlítását követően az alábbi feltételek érvényesülése mellett: $p < 0,05$; $\log_2FC > |1|$. Rövidítések: N- egészséges; AD- adenóma.

miRNS azonosító	N vs. AD	
	p érték	Log2 FC
hsa-miR-31	3,1E-05	-3,05
hsa-miR-183*	1,3E-09	-2,10
hsa-miR-182	7,6E-11	-1,93
hsa-miR-31*	2,8E-03	-1,57
hsa-miR-183	7,6E-05	-1,57
hsa-miR-584	8,6E-09	-1,51
hsa-miR-4417	5,7E-04	-1,50
hsa-miR-96	1,9E-06	-1,45
hsa-miR-34a*	3,0E-06	-1,34
hsa-miR-29b-1*	1,3E-04	-1,31
hsa-miR-27a*	7,5E-08	-1,31
hsa-miR-34a	3,2E-09	-1,25
hsa-miR-21*	4,1E-09	-1,17
hsa-miR-592	4,5E-03	-1,15
hsa-miR-4449	9,6E-05	-1,13
hsa-miR-625	1,2E-07	-1,10
hsa-miR-3663-3p	5,8E-04	-1,05
hsa-miR-224	1,7E-05	-1,04
hsa-miR-720	1,1E-02	-1,02
hsa-miR-181c*	1,1E-05	-1,01
hsa-miR-135b*	5,6E-08	-1,00
hsa-miR-299-5p	1,1E-05	1,62
hsa-miR-376c	6,4E-06	1,53
hsa-miR-215	1,1E-07	1,52
hsa-miR-10b	2,7E-08	1,48
hsa-miR-133b	4,7E-06	1,42
hsa-miR-133a	4,3E-05	1,38
hsa-miR-1	5,1E-05	1,36
hsa-miR-139-5p	3,7E-09	1,31
hsa-miR-195	4,4E-07	1,29
hsa-miR-150	1,6E-06	1,23
hsa-miR-10b*	8,0E-07	1,21
hsa-miR-381	1,1E-06	1,20
hsa-miR-99a	5,8E-05	1,07
hsa-miR-154	8,1E-06	1,06
hsa-miR-9*	9,1E-06	1,02
hsa-miR-199b-3p	6,7E-08	1,01
hsa-miR-199a-3p	6,6E-08	1,00