

MikroRNS eltérések vizsgálata a vastagbél-daganat kialakulása során

Doktori tézisek

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**

1. BEVEZETÉS

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. Komoly népegészségügyi problémát jelent Magyarországon is, évente 9000 új megbetegedést és 5000 új halálesetet regisztrálnak. Az adenómák a leggyakoribb neoplasztikus elváltozások, amelyek a vastagbélben megtalálhatóak, azonban az irodalomban kevés epidemiológiai adat áll rendelkezésre. A vastagbélrák molekuláris patogenezise igen heterogén. Az ép vastagbél nyálkahártya sejteiben bekövetkező daganatos elváltozások hátterében génmutációk, epigenetikai módosulások, többek között bizonyos gének promóter régiójában jelentkező hipermetiláció állhat. Ezen folyamatok összessége szabja meg a karcinogenezis folyamatát. A fejlődés menet során a mutációk számának növekedésével a genetikai instabilitás is fokozódik.

A vastagbélrák kialakulásában egyéb epigenetikai folyamatok is szerepet kapnak. A miRNS-ek felfedezésének robbanásszerű növekedésével egy új epigenetikai szabályozó elem vált ismertté a nem-kódoló RNS-ek családjából. A miRNS-ek olyan rövid (18-23 nukleotid), konzervált egyszálú RNS-ek, amelyek szintén befolyásolhatják a daganatképződést. Szabályozási mechanizmusuk, a poszttranszkripciós géncsendesítés két fő módon valósulhat meg: a target mRNS degradációján és a transláció gátlásán keresztül. A miRNS-eknek szerepük lehet többek között a tumorok kialakulásában és progressziójában is, kóros kifejeződésük számos rákos megbetegedésre jellemző. Viselkedhetnek onkogénekként (onkomiR) vagy tumorszuppresszorokként, így befolyásolhatják a daganatfejlődésben szerepet játszó gének expresszióját.

Jelentős mennyiségű daganat-specifikus miRNS detektálható teljes vérből, szérumból, plazmából valamint egyéb testfolyadékokból is, köszönhetően a stabil szerkezetüknek és az RNáz enzimekkel szembeni ellenállásuknak. Jelenlegi hipotézisek szerint a keringő miRNS-ek szöveti károsodás során passzív módon kerülnek ki a véráramba. A plazmából vagy szérumból származó miRNS-ek folyadék biopszia („liquid biopsy”) markerként hasznosak lehetnek a diagnosztikai területeken is. 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 információként szolgálhat a kibocsátó vagy akár a fogadó sejt eredetéről, valamint annak heterogenitásáról és a malignitás fokáról.

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám célja:

- a vastagbélrákban és a rákmegelőző tubuláris és tubulovillózus vastagbél adenómákban megváltozó miRNS kifejeződési mintázat globális microarray módszer 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.

3. MÓDSZEREK

Kísérleteink során rutin kolonoszkópiás mintavételezésekből származó humán vastagbél biopszia és párosított plazma mintákkal dolgoztunk. Az izoláló módszerek összevetéséhez formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) műtétiileg eltávolított mintákat vizsgáltunk.

3.1. Vastagbélrák és adenóma szövetminták miRNS expressziós profiljának meghatározása

3.1.1. miRNS expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával

A kísérlet során 20 egészséges, 11 tubuláris, 9 tubulovillózus adenómás és 20 vastagbélrákos beteg biopsziás mintáit vizsgáltuk miRNS microarray módszerrel. A biopszia mintákból teljes RNS frakciót vontunk ki a High Pure miRNS Izoláló kit (Roche Applied Science) segítségével. Az RNS minták koncentrációját Qubit High Sensitivity RNA Assay kitet alkalmazva a Qubit 1.0 fluoriméter (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztuk meg, az RNS intaktságát 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, USA) készülékkel az Agilent RNA Pico 6000 kittel vizsgáltuk. A miRNS expressziós profilt GeneChip miRNA 3.0 array (Affymetrix, USA) módszerrel elemeztük. A microarray vizsgálatokból származó nyers probe cell értékeket az Expression Console Szoftverrel (Affymetrix) értékeltük. 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 $\log_{2}FC > |1|$.

3.1.2. A biopsziamintákon vizsgált valós-idejű kvantitatív PCR analízise

A biopsziamintákból izolált RNS molekulákat tartalmazó mintákból négy csoportot alakítottunk ki. Betegcsoportonként két-két poolozott mintát generáltunk, az egészséges és tumoros csoportban 10-10, amíg a tubuláris és tubulovillózus esetén 11-9 mintát öntöttünk össze. Az RNS minták cDNS szintéziséhez miRCURY™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Dánia) módszert alkalmaztunk, a qPCR reakciókat az LC480 (Roche Applied Science) valós-idejű PCR gép használatával végeztük el.

3.1.3. mRNA expressziós vizsgálat Human Transcriptome Array 2.0 rendszeren

A 20 vastagbél biopsziából izolált RNS mintákból (7 normál, 2 tubuláris, 4 tubulovillózus adenóma és 7 tumor) mRNA expressziós microarray vizsgálatot végeztünk. A mintákat GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 chipekre (Affymetrix) vittük fel.

3.1.4. *In silico* miRNA-mRNA target predikció

Három kiválasztott miRNA további funkcióját vizsgáltuk. Ezek közül 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 miRNA-ek, amelyek az adenóma-karcinóma átmenet során fokozatos felül- vagy alulexpressziót mutattak. A kiválasztott miRNA-ek mRNA 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.

3.1.5. A ciklin D1 immunhisztokémiai vizsgálata

A miR-497 prediktált target mRNA-ről átíródo ciklin D1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatát egészséges (n=15), valamint adenómás (n=15) és CRC-s (n=10) páciensekből származó FFPE metszeteken végeztük el, így a fehérje kifejeződés változása összevethetővé vált a biopsziákban mért korábbi miRNA és mRNA expressziós eredményeinkkel.

3.2. miRNA-profil vizsgálat párosított plazmamintákon

3.2.1. miRNA expressziós vizsgálat GeneChip miRNA 3.0 array használatával

A vizsgálatokat egészséges (n=4), tubuláris adenóma (n=4), tubulovillózus (n=4) adenóma és vastagbélrákos (n=4) plazmamintákon végeztük. A miRNA frakciót QIAamp Circulating Nucleic Acid Kittel (Qiagen, Németország) vontuk ki a plazmamintákból módosított protokoll szerint. A miRNA expressziós vizsgálatokat GeneChip miRNA 3.0 array használatával végeztük. A minták koncentrációját Qubit 1.0 fluoriméterrel (Thermo Fisher Scientific, USA) határoztuk meg az RNA High Sensitivity Assay Kit segítségével. A microarray vizsgálatokból származó nyers probe cell értékeket az Expression Console Szoftverrel (Affymetrix) értékeltük.

3.2.2. Valós-idejű kvantitatív PCR analízis

A PCR vizsgálatokat a miRCURY™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Dánia) módszerrel végeztük. A plazmaminták esetén a SNORD49A miRNS-t használtuk normalizáláshoz. A qPCR reakciókat az LC480 (Roche Applied Science) valós-idejű PCR gép használatával vizsgáltuk.

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

3.3.1. Eltérő RNS izoláló módszerekkel történő RNS izolálás

A deparaffinált 3 CRC és párosított 3 NAT FFPE szövetmintákból négyféle módon RNS-t izoláltunk a gyártók utasításai szerint. A miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon, Dánia) és a High Pure miRNA Isolation Kit (Roche) kézi izolálási módszerekkel miRNS frakciót nyertünk ki a mintáinkból. A High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Németország) kézi, és a MAGNA Pure 96 (Roche, Németország) automata izolálási eljárások a teljes RNS frakció kinyerését teszik lehetővé.

3.3.2. 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 reagenseivel vizsgáltuk.

3.3.3. 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-t.

3.3.4. 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 vizsgálata 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).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A miRNS kifejeződés microarray-alapú vizsgálata vastagbél szövetmintákban

A microarray vizsgálatainkra alapozva a vastagbél adenóma-karcinóma átmenet során 19 miRNS-t választottunk ki, amelyek expressziója folyamatos emelkedést vagy csökkenést mutatott a betegség progressziója mentén. 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. Nyolc 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. Huszonhárom miRNS (ebből 11 csökkent, 12 fokozott expressziójú) kifejeződése egészséges vastagbél szövetekben szignifikáns eltérést mutatott a rákelőző adenóma és a tumoros mintákhoz viszonyítva. A legmagasabb expressziót a miR-31 esetében figyeltük meg, az ép szövetekhez viszonyítva nyolcszoros emelkedést tapasztaltunk mind adenóma, mind CRC mintákban. Az adenóma és vastagbélrákos mintákat összehasonlítva 24 miRNS felelt meg az általunk felállított szignifikancia kritériumoknak ($p < 0,05$, $\log_{2}FC > |1|$), ezek közül összesen öt miRNS mutatott emelkedett expressziót CRC-ben. A miR-489 esetén mértük a legnagyobb, több mint 4,5-szörös expresszió növekedést a tubulovillózus adenómákban a tubuláris adenómákhoz képest. A vastagbélrákos mintákat Dukes-stádium beosztás alapján is megvizsgáltuk, a miRNS-ek többsége fokozott kifejeződést mutatott Dukes D stádiumú vastagbélrákban. Az adenóma vs. karcinóma összehasonlításban az eltérően expresszáló miRNS-ek nagyobb hányada az adenóma mintákban mutatott magasabb kifejeződést a CRC mintákhoz képest. 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. Az adenóma mintákban legnagyobb kifejeződést mutató miRNS-ek (miR-182, a miR-183*, a miR-96 és a miR-34a) expressziója 29%-kal csökkent a rákos mintákban az adenóma mintákhoz hasonlítva. Azon miRNS-ek csoportján, amelyek kifejeződésének eltérését sikeresen kimutattuk microarray módszerrel a különböző betegcsoportok között, valós idejű PCR validációs vizsgálatokat végeztünk.

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

A CRC progressziója során folyamatosan növekedést vagy csökkenést, valamint az adenómás és vastagbélrákos szövetmintákban az egészségesekhez hasonlítva eltérő kifejeződést mutató miRNS-ek csoportjából három kiválasztott miRNS-nek (miR-31, a miR-4417 és miR-497) lehetséges mRNS célmolekuláit a miRWalk 2.0 felhasználói felületen határoztuk meg *in silico* elemzéssel. A Human Transcriptome Array 2.0 microarray használatával párhuzamos vizsgálatokat folytattunk, kiválasztottuk az azonos szövetmintákban alacsonyán expresszálandó mRNS-eket és az ellentétes irányú kifejeződési mintázatokat ábrázoltuk. Az útvonal analízis alapján a prediktált célmolekulák a rák kialakulásában szerepet játszó útvonalakban több mint 10%-ban érintettek a szabályozó útvonalak közül a rákos elváltozásokban szerepet játszó PI3K-Akt és MAP Kináz jelátviteli útvonalakat azonosítottuk. A GO adatbázisban fellelhető biológiai folyamatok elemzése szerint az általunk vizsgált miRNS-ek a transzkripció és a sejtproliferáció szabályozásában fontosak.

4.1.2. 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 vastagbéliszövetben. A stróma ciklin D1 fehérje expressziója kis mértékben, de szignifikánsan ($p < 0,05$) emelkedett adenómában. Heterogén, szignifikánsan növekedő ciklin D1 kifejeződést mértünk az adenóma és CRC minták hámsejtjeiben. Szignifikáns ciklin D1 fehérje kifejeződésbeli ($p < 0,05$) különbséget találtunk az ép-adenóma és az adenóma-CRC hám és stróma összehasonlítás során.

4.2. A szöveti- és plazmamintákban megváltozó miRNS expresszió vizsgálata

Tubuláris, tubulovillózus adenóma és vastagbélrákos betegek plazmamintáiból miRNS microarray vizsgálatot végeztünk. Az egészséges kontrollokban 306 miRNS, az adenómás betegekben 334, míg a CRC-s mintákban 321 miRNS kifejeződését tapasztaltuk. A kapott eredményeket összehasonlítottuk a biopsziás microarray vizsgálatok során kimutatott miRNS-ek számával. Azt tapasztaltuk, hogy a vastagbéliszövetben – függetlenül a betegcsoportoktól – egy időpillanatban kifejeződő miRNS-ek száma 350-500, plazmában 150-450 tartományban van. Adott szöveten belül a vizsgált betegcsoportokban kifejeződött miRNS-ek számában nem tapasztaltunk

szignifikáns eltérést. Ezzel szemben a különböző klinikai csoportok között eltérő miRNS expressziós profilokat találtunk. Az egészséges és vastagbélrákos plazmaminták között 14 miRNS szignifikáns ($p < 0,05$) eltérését mértük. A szignifikáns különbségek többségét ebben az összehasonlításban találtuk. Nem figyeltünk meg szignifikáns expressziós eltérést a tubuláris adenóma és az egészséges minták között, 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. 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.

4.2.1. 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 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

4.2.2. Plazma-specifikus 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. Az adenóma vs. egészséges összehasonlításban a kiválasztott miRNS-ek nem mutattak megegyező irányú expressziós változásokat a szöveti párosított minták esetén tapasztaltakkal összehasonlítva. A miR-3689f, a miR-4723-3p és a miR-203 egészséges mintákban fokozott expressziót mutatott a neoplasztikus betegcsoportéhoz képest, habár

ezek a kifejeződések alacsonyabb intenzitásúak voltak, mint az egészséges szöveti párosított mintájukban. A miR-548d-3p volt az egyetlen miRNS, amelyik az adenóma vs. CRC összehasonlításban mind szöveti mind plazma mintákban azonos expressziós mintázatot mutatott

4.3. 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, integritását vetettük össze. A kizárólag miRNS frakciót kivonó módszerek nukleinsav kihozatalát tekintve alacsonyabb RNS mennyiséggel voltak jellemezhetőek a teljes RNS spektrumot izoláló eljárásokhoz képest. 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. A teljes RNS frakciót izoláló módszerek elektroferogramjain jól látható, hogy a kinyert RNS töredezett, elsősorban a rövid nukleotid-hosszúságú szakaszok jellemzőek.

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

Mind a négy izoláló módszer esetén elmondható, hogy több miRNS-t tudunk kimutatni az első panelen, mint a másodikon. 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. 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. A teljes RNS izoláló módszerek esetén magasabb Cp-értékeket figyeltünk meg, ami azzal magyarázható, hogy a teljes RNS frakciónak csak kis hányadát képezték a miRNS-ek.

4.3.2. A vastagbél-specifikus miRNS-ek összehasonlító elemzése

A mintákban kifejeződő miRNS-ek relatív kvantifikációjához, az irodalom szerint leggyakrabban használt (U6, SNORD38B, SNORD49A) referencia miRNS-eket alkalmaztunk továbbá egy általunk választott, a mintacsoportok között a legkisebb szórást mutató miRNS-t (miR-490-3p) is vizsgáltunk. Két vastagbélrák-specifikus

miRNS-t (miR-21 és miR-34) választottunk ki, és megvizsgáltuk az eltérő referencia miRNS-ekből adódó ΔC_p -értékeket a különböző RNS/miRNS izolálási módszerek esetén. A miRNS izoláló kitékkel kinyert mintákban alacsonyabb C_p -értékeket kaptunk, míg a teljes RNS minták magasabb C_p -értékeket mutattak, azaz a ΔC_p -értékek attól függően, hogy miRNS vagy teljes RNS módszert alkalmaztunk, eltérő tartományba estek. A klinikai csoportok közötti $\Delta\Delta C_p$ -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. Amennyiben a normalizációt a SNORD38B rövid RNS-sel végeztük, ezek a különbségek kisebbek lettek.

5. 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 továbbá 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmar A, Bartak BK, Tulassay Z, Molnar B (2016) miRNA Isolation from FFPE 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**

6.2. Egyéb - nem az értekezés témájában megjelent közlemények

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

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**

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, 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**

7. 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 Krisztinának;

-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;

-Kónyáné 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 Máriaának minden adminisztratív feladat megoldásában nyújtott segítségéért;

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

-és nem utolsó sorban családom kitartó támogatását és buzdítását.