

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

Doktori értekezés

Kalmár Alexandra

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Ponyi Tamás, Ph.D., tudományos és applikációs munkatárs

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

Bár a szűrővizsgálatok egyre nagyobb hangsúlyt kapnak, a vastagbél daganatok (CRC) nagy hányadának diagnózisa csak a tumor előrehaladott állapotában történik, mikor a túlélési esélyek jelentősen lecsökkentek. A CRC-t a fejlett nyugati világban, köztünk hazánkban kiemelkedően magas incidencia és mortalitás jellemzi. Annak ellenére, hogy napjainkra számos vizsgálat eredményeként egyre több ismeret halmozódik fel, a vastagbél daganatok kialakulása során jelentkező molekuláris változások csak részben ismertek.

Közismert tény, hogy a vastagbél daganatok fejlődése során különböző génekben expressziós különbségek mutathatók ki. Számos tanulmány teljes genom expressziós vizsgálatok eredményei alapján olyan klinikailag hasznosnak bizonyuló markerek azonosítását célozta, amelyek később a rutin diagnosztika részeként a daganatok hatékonyabb osztályozását segíthetik. Munkacsoportunk a vastagbél daganatok és egészséges vastagbél szövetek elkülönítésére egy 11 tagú transzkriptum szettet azonosított.

Sokféle daganatos megbetegedés, köztük a CRC kialakulása során - a genetikai változások mellett - az epigenetikai szabályozó mechanizmusok megváltozott működése számos gén kifejeződésére hatással van. A leggyakrabban vizsgált epigenetikai jelenség a DNS metiláció, amelynek aberráns szintje az érintett gén csendesítéséhez vezethet. A miRNS-ek általi poszttranszkripcionális szabályozás szintén génexpressziót csökkentő hatással bír.

A vastagbél daganatok kialakulása során már számos olyan gént azonosítottak, amely a daganat kialakulása során DNS metilációs csendesítés alá kerül. Már az aberráns kromoszómális lokuszokban (ACF) is kimutatható néhány gén, mint pl. a *RASSF1A*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *MINT1* és a *MINT31* lokuszok hipermetilációja, és az adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során is számos hipermetilált gén ismert. A szövetmintákon kívüli non-invazív mintavételezéssel, vérplazma és székletmintákban is detektálhatóak olyan DNS metilációs markerek, amelyek a vastagbél kialakulására jellemzőek. Vastagbél daganatok legismertebb plazma DNS metilációs markere a Septin 9 (*SEPT9*), amelynek a vérplazmában detektálható DNS hipermetiláció az adenoma-karcinoma szekvencia során igazoltan növekszik. Bár a keringő *SEPT9* DNS metilációs szintjét vérplazma mintákból mára már magas szenzitivitással és specificitással tudjuk mérni, arról napjainkban is viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre, hogy a DNS hipermetiláció a vastagbél szövetben milyen mértékű és ez hogyan befolyásolja a gén mRNS és fehérjeszinten való kifejeződését.

A génexpressziós vizsgálatok során elemzett legideálisabb mintatípus a friss fagyasztott szövet, amelyből kivont nukleinsavakat magas integritás és tisztaság jellemzi. A vastagbél kóros elváltozásainak diagnózisa rutin endoszkópiával nyert biopsziás vagy műtétilag eltávolított szövetminták FFPE blokkjainak metszeteiből történik. A formalinos fixálás tökéletesen megőrzi a szövetek struktúrális felépítését, azonban a molekuláris szerkezet szempontjából technikai hátrányokkal jár. Ezáltal az FFPE mintákból izolált RNS gyakran alacsony integritással rendelkezik, emiatt az FFPE szövetek a génexpressziós vizsgálatok során kihívást jelentő mintáknak számítanak. Annak érdekében, hogy az FFPE minták használhatósága egyre bővülhessen, a manuális és automatizált nukleinsav izoláló metodikák folyamatos fejlesztés alatt állnak.

Egy adott szövettípust alkotó sejtek különböző transzkripciós profillal rendelkeznek. Ezen különbségek felderítésére hasznos technika lehet az *in situ* hibridizáció, amely nem csak a kifejeződés mértékéről, hanem a szövetbeli, akár sejtbeli lokalizációról is információt szolgáltat. Ahhoz, hogy a szöveti mintákban lévő sejtekről bővebb információt nyerjünk, szükség van a különböző sejtípusok elválasztására, amely a szövettani metszeteken végzett lézer mikrodisszekcióval (LCM) valósítható meg.

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám vizsgálati céljait az alábbi pontokban határoztam meg:

- 1, Friss fagyasztott műtéti és formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) vastagbél szövetmintákból történő automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.
- 2, Munkacsoportunk által publikált, friss fagyasztott vastagbél szövetminták teljes genomszintű génexpressziós vizsgálata során azonosított, a diagnosztikai csoportokat elkülönítő transzkriptum szett FFPE szövetmintákon való vizsgálata.
- 3, Friss fagyasztott műtéti, biopsziás és FFPE vastagbél szövetmintákból történő automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata.
- 4, A vastagbél-daganatok kialakulása során génexpressziós változást mutató gének azonosítása és lehetséges szabályozási mechanizmusaik (DNS metiláció, miRNS) vizsgálata.
- 5, A klinikai gyakorlatban is alkalmazott, a vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia során hipermetilálódó *SEPT9* vérplazma marker DNS metilációs vizsgálata vastagbél-szövetből izolált hám és stromasejteken.

3. MÓDSZEREK

Vizsgálataink során összesen 268 vastagbél szövetminta elemzésére került sor. A vizsgált mintacsoportban 114 CRC, 34 adenoma, 107 tumor mellől származó normál adjacens (NAT) és 18 egészséges vastagbél szövetminta volt.

3.1 Vastagbédaganatokra jellemző mRNS markerek automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon való vizsgálata

3.1.1 Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

3.1.1.1 Automatizált RNS izolálás

A 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT friss fagyasztott, valamint ugyanazon biológiai szövetekből készített 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT FFPE szövetminta automatizált RNS izolálását MagNA Pure 96 Cellular Large Volume Kit (Roche, Penzberg, Németország) használatával a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszeren végeztük. A manuális RNS kivonást RNeasy Mini Kit illetve RNeasy FFPE kitek (Qiagen, Hilden, Németország) használatával végeztük. Az RNS koncentrációt a NanoDrop 1000 spektrofotométer készülékkel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) mértük. Az RNS minőségét az RNA 6000 Pico LabChip kit használatával az Agilent BioAnalyzer 2100 mikrokapilláris elektroforézis (Agilent, Santa Clara, USA) rendszeren határoztuk meg.

3.1.2 Vastagbédaganatokra jellemző RNS markerek FFPE mintákon való vizsgálata

3.1.2.1 Automatizált RNS izolálás

15 CRC és 15 egészséges vastagbél biopszia, valamint 15 CRC és a hozzátartozó 15 NAT FFPE minta RNS izolálását MagNA Pure 96 Cellular Large Volume Kit (Roche, Penzberg, Németország) használatával a MagNA Pure 96 automatizált nukleinsav izoláló rendszeren végeztük. A minőség-ellenőrzés a 3.1.1.1 fejezetben leírtakkal megegyezett.

3.1.2.2 Génexpressziós vizsgálat

A reverz transzkripciót 150 ng teljes RNS mintából végeztük a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) használatával. A 11, korábbi microarray vizsgálataink során azonosított CRC-specifikus transzkriptum (CA7, COL12A1, CXCL1, CXCL2, CHI3L1, GREM1, IL1B, IL1RN, IL8, MMP3, SLC5A7) és a 18S riboszómális RNS belső kontroll kifejeződését valós-idejű PCR módszerrel vizsgálatuk RealTime Ready® próbák

felhasználásával. Az RT-PCR reakciókat LightCycler® 480 készülék (Roche) használatával végeztük.

3.1.2.3 In situ hibridizációs vizsgálat

Az mRNS *in situ* hibridizációt a 11 transzkriptum közül kiválasztott két marker, a csökkenő kifejeződést mutató karbon-anhidráz VII (CA7), a vastagbél-daganatokban fokozott expressziójú kemokin (C-C-C motívum) ligandum 1 (CXCL1) esetén végeztük el. A vizsgálat során két-két nem átfedő ún. lakolt/kötött nukleinsav (Locked nucleic acid – LNA) oligonukleotid próbákat a két mRNS-re tervezve, valamint egy negatív és egy pozitív (miR-126) próbát használtunk. A jelölt metszeteket Panoramic 250 digitális szkener segítségével digitalizáltuk (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország).

3.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetminták vizsgálata

3.2.1 Automatizált DNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

3.2.1.1 Automatizált DNS izolálás

A 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT friss fagyasztott szövetminta, 10 CRC és 10 egészséges vastagbél biopszia, valamint 10 CRC és a hozzátartozó 10 NAT FFPE minta automatizált DNS izolálása a MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit felhasználásával, a manuális DNS kivonás a QIAamp DNA Mini Kit illetve QIAamp DNA FFPE Kit (Qiagen) alkalmazásával történt. Az izolált DNS mennyiségét (OD260) és tisztasági értékeit (OD260/230, OD260/280) NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo-Fischer) segítségével határoztuk meg.

3.2.1.2 DNS metilációs vizsgálat

Az izolált DNS mintákat EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, Irvine, USA) segítségével konvertáltuk 1 µg input DNS mennyiséggel. Három különböző gén (*MAL*, *SFRP1*, *SFRP2*) DNS metilációs szintjének megállapításához biszulfid-specifikus polimeráz láncreakciót (BS-PCR), majd ezt követően metiláció-specifikus nagy felbontású olvadáspont elemzést (MS-HRM) alkalmaztunk 10 ng/reakció biszulfid konvertált DNS felhasználásával. A reakciót LightCycler 480 PCR készülékben végeztük, a HRM görbék elemzését LightCycler GeneScanning alkalmazásával, az ismert metilációs százaléku standard minták alapján végeztük.

3.2.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákon

3.2.2.1 Lézer mikrodisszekció

A friss fagyasztott szövetmintákból hám és stromasejteket (10^3 sejt/minta) PALM Microbeam lézer mikrodisszektor segítségével szeparáltunk. A makrodisszektált mintákat toluidinkék festett fagyasztott metszetekről gyűjtöttük.

3.2.2.2 DNS metilációs vizsgálat

A biszulfid konverziót előzetes DNS izolálás nélkül, a gyűjtött sejtekből EZ DNA Methylation Direct Kit használatával (Zymo Research) végeztük a gyártói utasítások alapján. A BS-PCR reakciókat 1 ng biszulfid konvertált DNS/reakció mennyiséggel, LightCycler 480 készülékben végeztük 18 gén esetén (*ALDH1A3*, *BCL2*, *CDX1*, *COL1A2*, *CYP27B1*, *ENTPD5*, *FADS1*, *MAL*, *PRIMA1*, *PTGDR*, *PTGS2*, *SFRP1*, *SOCS3*, *SULT1A1*, *THBS2*, *TIMP1*, *SFRP1*, *SULF1*). Vizsgálatunk során PyroMark Q24 és GS Junior szekvenátor készüléket használtunk.

3.2.2.3 Immunhisztokémia

Az SFRP1 fehérjét CRC melletti NAT (n=10), adenoma (n=10) és CRC FFPE mintákon (n=10) anti-SFRP1 poliklonális ellenanyaggal (ab4193, Abcam, Nagy-Britannia, 1:800 hígítás) mutattuk ki.

3.2.2.4 miRNS vizsgálat

CRC (n=3), adenomas (n=3) és NAT (n=3) független FFPE mintákból a High Pure miRNA kit (Roche) miRNS izolálást végeztük, majd közel 800 miRNS kifejeződését a Human Panel I + II (Exiqon) RT-PCR módszeren alapuló array segítségével végeztük, majd kiválasztott miRNS-ek expresszióját hasonlítottuk össze a csoportok között. *In silico* miRNS predikciót a miRWALK programmal végeztünk.

3.3 A SEPT9 gén DNS metilációs szintjének lézer mikrodisszektált hám és stromális sejtekben való vizsgálata

3.3.1 Lézer mikrodisszekció

3 CRC és a hozzátartozó 3 NAT friss fagyasztott szövetmintából és 3 egészséges vastagbél biopsziából LCM segítségével vastagbél hám és stromasejteket izoláltunk. A vizsgálatban a tumortól maximum 1 cm-re (NAT1) illetve legalább 10 cm-re (NAT2) elhelyezkedő normál adjacens területeket is vizsgáltunk.

3.3.2 DNS metilációs vizsgálat

A lézer mikrodisszektált sejtekből kiinduló biszulfít konverziót EPI proColon 2.0 kit módosított protokollja alapján végeztük. Mintánként 2 ng biszulfít konvertált DNS-t használva 13 régió felszaporítására alkalmas kétlépéses multiplex amplifikációt végeztünk. A keletkező amplikonok szekvenálását Sanger egy ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Waltham, USA) készüléken végeztük. A CG dinukleotidok metilációs százalékát a C nukleotidok összes C és T nukleotidhoz hasonlított aránya adta meg. Egy adott amplikonban lévő CG metilációs értékeket átlagoltuk, majd hasonlítottuk össze a különböző mintatípusokban.

3.3.3 Immunhisztokémiai vizsgálat

A Septin 9 fehérje kifejeződését CRC melletti NAT (n=3), adenoma (n=3) és CRC FFPE mintákon (n=3) anti-Septin 9 elsődleges antitest (Abnova PAB4799, Németország, 1:50 hígítás) használatával mutattuk ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Vastagbél-daganatokra jellemző mRNS markerek automatizáltan izolált friss fagyasztott biopsziás és FFPE mintákon való vizsgálata

4.1.1 Automatizált RNS izolálás alkalmazhatóságának vizsgálata

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

Az izolált RNS minta tisztaságára jellemző OD_{260/280} és OD_{260/230} értékek különbözőnek adódtak a két izolálási módszert összehasonlítva. Az automata izolálás során a friss fagyasztott minták értékei a kézi izolálás eredményeihez hasonlóan bizonyultak, azonban az FFPE minták esetén alacsonyabbnak adódtak, míg a kézi izolálású minták OD_{260/280} értékei mindkét mintatípus esetén magasak voltak. Az RNS töredezettség mentességét kifejező RIN értékek (1-10) a friss fagyasztott minták esetén magasabbak voltak az FFPE mintákhoz hasonlítva mind az automatizáltan, mind a manuálisan izolált minták esetén.

4.1.2 Vastagbél-daganatokra jellemző RNS markerek FFPE mintákon való vizsgálata

Mindkét szövettípusból nyert RNS mintákra hasonló RNS kihozatal volt jellemző (átlag \pm szórás; biopsziák: normális= $5,98 \pm 1,72$ μg RNS, tumor= $5,77 \pm 2,27$ μg RNS, FFPE: normális= $4,20 \pm 3,70$ μg RNS, tumor= $7,10 \pm 3,30$ μg RNS). Az OD_{260/280} és OD_{260/230} arányok biopsziákban szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabbak lettek, mint az FFPE mintákban. A RIN értékek a fagyasztott biopsziákból izolált RNS minták esetén lényegesen ($p < 0,001$) magasabbnak adódtak, mint az FFPE szövetekből származó RNS mintákban.

A korábbi vizsgálataink során azonosított 11 CRC-specifikus marker géneexpressziós eredményeinek előzetes csoportmegadás nélküli hierarchikus klaszter elemzés alapján az egyik csoportban a CRC minták és egy átsorolódott ép minta, a másik csoportban csaknem az összes ép minta (14/15) és átsorolódott CRC esetek (8/15) adódtak. Az FFPE minták elkülönítése majdnem teljesen tökéletesen szétválasztotta a CRC és ép eseteket. Diszkriminációs analízissel a biopsziákat maximális hatékonysággal sikerült elkülöníteni (100%; 100%). Az FFPE minták közül 6 ép és 8 tumoros minta automatikusan kizáródott az elemzésből, a maradék 9 ép és 7 tumorminta helyes klasszifikációja maximális volt (100%; 100%). A 11 tagú marker csoport géneexpressziós eredményei alapján többszörös logisztikus regresszió segítségével az egészséges és tumoros biopsziák 93,3%-os szenzitivitással és

86,7%-os specificitással voltak elkülöníthetőek. Ezzel szemben az FFPE szöveteket magasabb specificitással (96,7%), de alacsonyabb (70,0%) szenzitivitással tudtuk megkülönböztetni. A karbon-anhidráz 7 (*CA7*) és a kemokin ligandum 1 (*CXCL1*) transzkriptumok *in situ* mRNS hibridizációs kísérletek a PCR során látott kifejeződésbeli változásokat tükrözték a vastagbél adenoma-karcinoma szekvencia során.

4.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákon

4.2.1 Automatizált DNS izolálás alkalmazás vizsgálata

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

Az OD260/280 arányok a friss fagyasztott minták (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,87 \pm 0,07$; kézi: $1,88 \pm 0,11$) és a biopsziák (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,94 \pm 0,04$; kézi: $1,93 \pm 0,04$) esetén hasonlóak voltak. Néhány automatikus módszerrel izolált normális FFPE minta OD260/280 aránya a friss fagyasztott és biopsziás mintákénál alacsonyabb volt. A kézi módszerrel izolált FFPE minták OD260/280 aránya szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb volt (átlag OD260/280 \pm SD; automata: $1,83 \pm 0,06$; kézi: $2,00 \pm 0,04$). A friss fagyasztott minták viszonylag magas OD260/230 aránnyal rendelkeztek (átlag OD260/230 \pm SD; automata: $2,01 \pm 0,46$; kézi: $1,85 \pm 0,35$), ezek az értékek az automatikus izolált mintákban voltak magasabbak. A biopsziás minták esetén hasonló eredményeket kaptunk (átlag OD260/230 \pm SD; automata: $2,71 \pm 0,56$; kézi: $2,23 \pm 0,13$). Az FFPE minták kézi izolálása után magas OD26/230 arányok voltak mérhetőek (átlag OD260/230 \pm SD; automata: $1,81 \pm 0,35$; kézi: $1,95 \pm 0,27$).

A biopsziás és a friss fagyasztott minták DNS metilációs eredményei hasonlóan adódtak a különböző izolálási módszerek alkalmazása után (biopszia: $R^2_{MAL} = 0,93$; $R^2_{SFRP1} = 0,61$; $R^2_{SFRP2} = 1,00$; friss fagyasztott: $R^2_{MAL} = 0,72$; $R^2_{SFRP1} = 0,69$; $R^2_{SFRP2} = 0,76$). Az FFPE mintáknál ezzel szemben ez a korreláció alacsonyabb volt ((FFPE: $R^2_{MAL} = 0,09$; $R^2_{SFRP1} = 0,89$; $R^2_{SFRP2} = 0,89$). A három vizsgált gén közül a *MAL* primer pár eredményei különböztek leginkább, míg az *SFRP1* és az *SFRP2* gének eredményei között erős korrelációt találtunk.

4.2.2 DNS metilációs markerek azonosítása vastagbél szövetmintákon

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

Lézer mikrodisszektált hámsejtekben kimutatható szignifikáns expressziós változást ($p < 0,05$) a *SOCS3* és a *PRIMA1* gének mutattak az adenoma vs. ép összehasonlításban. A *BCL2*, a *CYP27B1*, a *COL1A2*, a *FADS1* és a *SULT1A1* gének kifejeződése csak a tumor-normál összehasonlításokban bizonyult szignifikánsnak ($p < 0,05$), míg a *CDX1*, a *ENTPD5*, a *PTGDR* és a *TIMP1* gének kifejeződése mindkét összehasonlításban változónak adódott.

HT-29 sejteken alkalmazott 5-aza-2'-deoxicitidin demetilációs kezelés hatására 4 vizsgált gén esetén (*TIMP1*, *FADS1*, *CYP27B1*, *SULT1A1*) csekély génexpressziós különbségeket tapasztaltunk, míg a *PTGS2* gén expressziója fokozódott és a *SOCS3* gén kifejeződése enyhén csökkent.

Az eredményeink szerint 18 megváltozott expressziójú transzkriptum közül 4 génhez tartozó 6 vizsgált régió mutatott szignifikáns DNS metilációs szint eltérést. Ezek közül a *COL1A2*, az *SFRP2* és a *SOCS3* gének vizsgált régiója adenoma és tumor mintákban hipermetilálódott, míg a *THBS2* hipometilációt mutatott a NAT mintákhoz képest.

A gének DNS metilációs adatait előzetes csoportmegadás nélküli (unsupervised) hierarchikus klaszter elemzéssel vizsgáltuk. Az első nagyobb csoport (*SFRP2*, *COL1A2*, *THBS2*, *SOCS3*, *CYP27B1*, *SULT1A1*, *PRIMA1*, *MAL*) viszonylag magas szintű DNS metilációt mutatott adenoma és tumoros mintákban is. A második csoportba sorolódó gének nem mutattak jelentős DNS metilációs szintbeli eltérést, míg a harmadik klaszterbe csak a relatív magas DNS metilációs szinttel rendelkező *THBS2* gén sorolódott. A lézer mikrodisszektált hámsejtek DNS metilációs eredményei alapján a biopsziás és a makrodisszektált mintákhoz hasonló csoportosítást kaptunk. A *PRIMA1*, az *SFRP1*, az *SFRP2*, a *MAL*, a *SOCS3*, a *CYP27B1*, a *COL1A2* és a *SULT1A1* gének viszonylag magas DNS metilációs szintjét tapasztaltuk mind vastagbél biopsziákban, mind az adenoma és tumoros szövetminták hámsejtjeiben.

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

Eredményeink alapján az SFRP1 fehérje mennyisége a vastagbél ép-adenoma-karcinoma átmenet során csökkenő kifejeződést mutat.

4.3 A SEPT9 gén DNS metilációjának lézer mikrodisszekált hám és stromális sejtekben való vizsgálata

Eredményeink alapján vastagbél daganatra jellemző DNS metilációs szintkülönbség kizárólag a harmadik CpG szigetben (CGI3) volt látható, míg a többi régió nem mutatott lényeges eltérést. A CGI3-ban centrálisan elhelyezkedő 5. amplikon jelentős DNS metilációs különbségeket mutatott a normális és az adenoma, valamint a tumoros szövetek között. Ez a különbség főként az epitheliális sejtekre volt jellemző. A normális és a tumoros hámsejtek DNS metilációs szintkülönbsége elérte a 80%-ot is ($p < 0,0001$), és ugyanilyen mértékű különbséget tudtunk kimutatni a normális vs. adenoma viszonylatban is. A NAT1 minták, amelyek a rezezált tumortól kevesebb, mint egy centiméterre helyezkedtek el, jelentős DNS metilációs szintkülönbséget mutattak a három vizsgált daganat közül kettő esetén a kontroll mintákhoz képest ($p < 0,0001$), míg a távolabbi ép területekről (NAT2) vett szövetmintákban ez a különbség nem volt kimutatható ($p > 0,05$). Ezzel ellentétben a tumor szövetekből izolált stromális sejtekben a normálishoz képest mintegy 50%-os hipermetiláció volt kimutatható, míg ez adenomákban 30%-os volt. A hámsejtekkel ellentétben a stromális sejtek nem mutattak DNS metilációs szintkülönbséget a NAT területeken. Szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabb Septin 9 fehérje szintet tudtunk kimutatni az egészséges minták és a NAT1 hám és stroma sejtjeiben, mint az adenoma vagy a tumoros mintákban, ahol csökkent Septin 9 fehérje kifejeződés volt jellemző.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

Összegezve elmondható, hogy az azonosított, DNS metiláció által szabályozott gének a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia mentén fontos szerepet tölthetnek be. Eredményeim hozzájárulhatnak a daganatképződés molekuláris hátterének pontosabb megismeréséhez és az azonosított markerek a jövőben a CRC korai felismeréséhez.

6. LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- A MagNA Pure 96 készülékkel automatizált módon elegendő mennyiségű és minőségű RNS kivonására van lehetőség biopsziás és FFPE mintákból egyaránt.
- Az általam vizsgált 11 tagú mRNS marker szett 96,7%-os szenzitivitással és 70,0%-os specificitással volt képes elkülöníteni az egészséges és a CRC FFPE szövetmintákat, így megállapítottam, hogy a CRC-specifikus transzkripciós szett megfelelően alkalmazható FFPE szövetanyagon is.
- Eredményeim szerint az automatikusan izolált DNS minták megfelelő kihozattal és tisztasággal rendelkeztek ahhoz, hogy további vizsgálatban alkalmasak legyenek DNS metilációs szint meghatározásra.
- Biopsziás, friss fagyasztott műtéti és FFPE minták manuális és automatizált DNS izolálását követően hasonló DNS metilációs eredményeket kaptam.
- Csökkenő génexpressziójuk alapján sikeresen azonosítottam olyan géneket, amelyek DNS hipermetilációs vagy miRNS szabályozás alatt állhatnak a kolorektális adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során
- A CRC kialakulása során csökkent génexpressziót és növekvő DNS metilációt mutató gének közül kettő esetében fehérjeszint csökkenést is igazoltam.
- Azokban a génekben, amelyek az adenoma-karcinoma szekvencia előrehaladása során nem mutatnak jelentős DNS hipermetilációt, egyéb epigenetikai szabályozó mechanizmusok, többek között miRNS szabályozás feltételezhető.
- A *SEPT9* gén DNS metilációs szintjét elsőként vizsgáltam lézer mikrodisszekált ép, NAT, adenoma, és tumoros minták hám és stróma sejteiben.
- Megállapítottam, hogy a vastagbél tumoros és adenoma mintákban a hámsejtek magas *SEPT9* DNS hipermetilációt mutatnak.
- Eredményeim alapján a *SEPT9* DNS hipermetiláció a gén promóter szakaszában található 3 nagyobb CpG sziget közül csak az egyikre korlátozódik, amely egybeesik a plazmaminták előszűrésére alkalmas Epi proColon 2.0 teszt által vizsgált szakasszal.

7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

7.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

7.1.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tóth K., Sipos F., **Kalmár A.**, Patai A.V., Wichmann B., Stoehr R., Golcher H., Schellerer V., Tulassay Z., Molnár B. - Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. (2012) PLoS One. 2012;7(9):e46000. doi: 10.1371/journal.pone.0046000. **IF: 3,730**

Patai Á.V., Valcz G., Hollósi P., **Kalmár A.**, Péterfia B., Patai Á., Wichmann B., Spisák S., Barták B. K., Leiszter K., Tóth K., Sipos F., Kovalszky I., Péter Z., Miheller P., Tulassay Z., Molnár B. - Comprehensive DNA methylation analysis reveals a common ten-gene methylation signature in colorectal adenomas and carcinomas. (2015) PLoS One. 2015;10:e0133836.**IF: 3,234**

7.1.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények

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

7.2. A disszertáció témájától eltérő témában megjelent közlemények

7.2.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

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

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

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

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

7.2.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

- programvezetőmnek, **Prof. Dr. Tulassay Zsolt** egyetemi tanárnak, akadémikusnak, és a II. sz. Belgyógyászati Klinika Igazgatójának, **Prof. Dr. Rácz Károly** egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;

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

- **Dr. Szücs Nikolette** és **Dr. Werling Klára** opponenseimnek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért és hasznos tanácsaikért;

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

- **Dr. Galamb Orsolyának**, akinek szakmai tanácsaira mindig számíthattam;

- **Dr. Valcz Gábornak**, **Dr. Krenács Tibornak** és **Dr. Sipos Ferencnek** a szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért;

- **Dr. Wichmann Barnabásnak** a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért;

- **Dr. Péterfia Bálintnak**, **Dr. Hollósi Péternek**, **Kovalszky Iona Professzorasszonynak**, **Kubák Viviennek**, **Dr. Kiss Katalinnak**, **Horváth Zsoltnak** és **Dr. Baghy Kornéliának**, akik nélkül a DNS metilációs vizsgálatok nem valósulhattak volna meg

- **Kónyáné Farkas Gabriella** és **Tóth Bernadett** asszisztenseknek a mintagyűjtés és az immunhisztokémiai munkákban nyújtott segítségéért;

- **Dr. Paku Sándornak**, **Bugyik Edinának** és **Dezső Katalinnak**, hogy az I. sz. Kísérleti Rákkutató Intézet Májpatológia Laboratóriumában fagyasztott metszeteket elkészíthettem

- a Semmelweis Egyetem, **II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópiájának** személyzete részére, akik nélkül a klinikai minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg;

- **Dr. Tóth Kingának**, **Dr. Leiszter Katalinnak**, **Dr. Patai Árpádnak**, **Barták Barbara Kingának**, **Nagy Zsófia Brigittának**, **Dr. Schöller Andreának** és **Fűri Istvánnak** laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért és barátságukért

- **Berczik Máriának** az adminisztratív feladatokban nyújtott segítségéért és barátságáért;

- a **Sejtanalitika Laboratórium minden tagjának** támogatásukért;

- **Családomnak** és **barátaimnak** PhD munkám során nyújtott biztatásukért.