

A tumorfejlődés stádiumainak jellegzetes molekuláris változásai vastagbél-daganatokban

Doktori értekezés tézisei

Spisák Sándor

Témavezető: Dr. Molnár Béla, az orvostudományok doktora

Programvezető: Prof. Dr. Tulassay Zsolt, egyetemi tanár



Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Opponensek: Dr. Kiss András egyetemi docens, Ph.D.

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

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Orosz László egyetemi tanár, DSc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár, DSc.

Dr. Patócs Attila, tudományos munkatárs, Ph.D.

Budapest

2011

BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések – köztük a vastagbél daganatos megbetegedései – napjaink egyik legnagyobb népegészségügyi problémáját jelentik. Diagnosztizálásuk, gyógyításuk és kutatásuk az orvostudomány egyik központi kérdésévé vált. Hazánkban évente közel 9000 új colorectális rákos esetet diagnosztizálnak, amelyből közel 6000 halállal végződik. A szakirodalomban és az exponenciálisan bővülő elektronikus adatbázisokban egyre több információt találhatunk a daganatos betegségek molekuláris jelenségeiről és annak folyamatairól. Az utóbbi tíz évben megjelent nagy-áteresztőképességű molekuláris biológiai módszereknek köszönhetően - amelyekkel nem csak célzottan kiválasztott géncsoportok, hanem a szervezetben működő valamennyi gén egyidejűleg vizsgálható - egyre több információ áll rendelkezésünkre a daganatok kialakulásának, fejlődésének megértéséhez, diagnosztizálásuk és talán gyógyításuk eredményesebbé tételéhez. Azonban a daganatok korai diagnosztizálása és a bennük történő molekuláris folyamatok megértése a hatalmas háttértudás ellenére sem tökéletes még. Jelenlegi tudásunk szerint a daganat a genetikai információban bekövetkező és felhalmozódó hibákra vezethető vissza. A betegség során az érintett szervben kóros szövetszaporulat jön létre a sejtek hibás osztódási folyamatainak eredményeként, ezáltal akadályozva a szerv normális működését. A folyamat azonban nem csak lokális zavarokat idéz elő, hiszen a regenerációs rendszer módosítása a tumor növekedésén túlmenően végső soron a daganat terjedéséhez is hozzájárul, ami a betegség drasztikus végkimenetelét okozza. Ebből adódóan a daganat inkább tekinthető szisztémás problémának, mintsem lokális elváltozásnak. Ezért fontos a rendszerszemléletű, és az egész szervezetre kiterjedő vizsgálatok tervezése és kivitelezése a rákkutatásban.

Ph.D. munkám során ezért a vastagbél-daganatok kialakulásának és progressziójának szövetspecifikus biomarker vizsgálatát, valamint a folyamat molekuláris biológiai hátterének további tisztázását – metiláció által szabályozott gének azonosítása és vizsgálata, kemoprevenció lehetőségének vizsgálata - tűztem ki célul teljes genom mRNS expressziós és fehérje microarray technikák segítségével.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim célja

- vastagbél műtéti minták gyűjtése és azok oligonukleotid- és ellenanyag microarray vizsgálatra való alkalmazhatóságának igazolása,
- diagnosztikus és prognosztikus fehérjemintázatok meghatározása ellenanyag microarray technológiával,
- az oligonukleotid és ellenanyag microarray rendszerek összevetése, előnyei, hátrányai, felhasználhatóságuk és korlátaik vizsgálata,
- fehérje és mRNS szint közötti összefüggések azonosítása vastagbél-daganatokban,
- a microarray vizsgálatok eredményeit igazoló (validációs) assay rendszer kifejlesztése és tesztelése fehérje (TMA) és mRNS (RT-PCR) szinten,
- a génexpressziós eredmények alapján a vastagbél-betegségek patomechanizmusával összefüggő károsodott biológiai útvonalak azonosítása,
- a vastagbél adenoma - dysplasia - carcinoma szekvencia génexpressziós hátterének kutatása lézer mikrodisszektált mintákon: olyan gének meghatározása, amelyek megváltozott expressziója indikátora lehet a colorectális karcinogenezisnek hám és stróma régiókban,
- metilációs szabályozás alatt álló gének azonosítása és funkcionális vizsgálata,
- COX-2 inhibitor és 5'-aza-2'-deoxycitidin terápiás ágensek hatásmechanizmusának vizsgálata.

VIZSGÁLATI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

1. Minták

Kutatásaimat fagyasztott vastagbél sebészeti mintákon és biopsziákon, valamint az ezekből készült fagyasztott metszeteken és az ezekkel párhuzamosan patológiai feldolgozásra kerülő FFPE mintákon végeztem. Az ellenanyag microarray vizsgálatokat 16 CRC-s (10 Dukes B és 6 Dukes D stádiumú) beteg sebészeti úton eltávolított mintáin végeztem. A lézeres mikrokimetszéshez 6 olyan DUKES B stádiumú, közepesen differenciált adenokarcinomából

készítettem metszeteket, amelyek polypoid képletet is tartalmaztak. Az egészséges és a beteg szövetekből paraffinba ágyazott, formalin fixált (FFPE) minták is készültek, melyek alapján a patológiai diagnózis, valamint az immunhisztokémiai festések és a TMA-k (szöveti microarray-k) készültek. A mintagyűjtést a TUKEB: 2005/037 számú engedélye alapján végeztem. A sejtkultúra microarray vizsgálatok esetében a kezelést 2 hatóanyag felhasználásával (az 5-aza-2'-deoxycitidin és az NS398) végeztem, kontrollként pedig a hatóanyagok oldószereit használtam.

2. Clontech AB 500 array vizsgálat

A nyers fehérje-preparátumot készítettem, majd monoreaktív Cy3 és Cy5 festékekkel (Amersham (GE Healthcare) jelöltem a gyártó előírása szerint. Ezt követően Clontech AB500 array-re (Clontech) hibridizáltam. A lemezeket Axon 4000B típusú szkennelvel (Axon Instruments, USA) digitalizáltam 532 és 635 nm-en. A gyártó által javasolt 33%-os lézererő, valamint 560 és 670 PMT erősítés, valamint 20um/pixel felbontás mellett, majd GenePix 4.1 szoftverrel értékeltem ki (Axon Instruments). Az arrayháló (Lot: 5010317) illesztése után meghatároztam a fluoreszcencia intenzitásokat.. Az elemzést R környezetben végeztem. Háttérkorrekciót végrehajtása után (RMA, normexp), a chiperedmények normalizációjára quantile metódust alkalmaztam.

3. Szöveti microarray (TMA) validáció

A fehérjehip eredményeit TMA lemezeken végzett immunhisztokémia technológiával igazoltam független minták bevonásával. A validációba 15 egészséges területről származó minta mellett 36 különböző lokalizációjú, differenciáltságú CRC-s mintát is bevontam. A szöveti microarray 2mm-es átmérőjű szöveti hengereket tartalmazott 24-es blokkokban. A TMA blokkokból 5 um-es sorozatmetszeteket készítettem, majd a következő immunhisztokémiai festéseket végeztem el: APC, Caveolin, CBP, cyclinA, ERK, HSP60, Cox2, EGFR, C-myc, Cald, Top1, DARPP32, MRE11A, AndrogenR, EPS8. A megfestett sorozatmetszeteket Mirax Desk rendszerrel digitalizáltam (3DHistech Kft, Budapest), majd TMA virtuális mikroszkóppal értékeltem ki (3DHistech kft, Budapest).

4. Immunhisztokémia

A deparaffinálást követően 20 perces hőindukciós antigén feltárást végeztem citrát pufferben. A kötődött ellenanyagokat standard indirekt immunoperoxidáz reakcióval vizualizáltam,

kromogénként Diaminobenzidint (DAB) használtam (Dako). Az immunhisztokémiai festésekhez Abgene és Dako antitesteket használtam, a gyártó utasításai alapján.

5. Lézeres mikrokimetszés (LCM- Laser Captured Microdissection)

A szövetekből kriosztátban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva $6\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettem, amelyek az LCM-hez használt, speciális membránbevonatú ($1\text{ }\mu\text{m}$ PEN) tárgylemezre (Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország) kerültek. A metszeteket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottam, majd felhasználáskor etanolos hígítási sorban való fixálás után Cresyl Violet acetát alkoholban oldódó festékekkel festettem. A lézeres kimetszéshez PALM Microbeam rendszert (PALM, Bernried) használtam. Munkám során mintánként átlagosan 5000-10000 sejtet gyűjtöttem.

6. Affymetrix teljes genom microarray analízis LCM mintákból

A kivont teljes RNS minőségét Agilent Bioanalyzer Pico 6000 Chip kit segítségével ellenőriztem, majd biotinnal jelölt cRNS próbákat szintetizáltam az Affymetrix 2 körös IVT (in vitro transzkripció) Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA) felhasználásával. Mintánként $10\mu\text{g}$ fragmentált cRNS-t hibridizáltam HGU133 Plus2.0 microarray-re (Affymetrix) 16 óráig 45°C -on. A chipeket Fluidic Station 450 berendezéssel mostam, és ellenanyag sokszorozó festési eljárással a használati útmutatónak megfelelően festettem (EukGE_Ws_2v5 mosási protokoll és $10\mu\text{g/ml}$ sztreptavidin-fikoeritrin (Molecular Probes)). A fluoreszcens jeleket GeneChip 3000 leolvasóval azonosítottam 570 nm -en.

7. Affymetrix U113 Plus 2.0 teljes genom chipek statisztikai kiértékelése

A minőségi elemzést a Tumour Analysis Best Practices Working Group ajánlásai alapján végeztem. Az előfeldolgozást GCRMA metodikával végeztem. A szignifikáns eltérést mutató géneket lineáris modellt és bayesian megközelítést alkalmazva határoztam meg a Bioconductor programcsomaggal R környezetben SAM (Significance Analysis of Microarrays) és PAM (Prediction Analysis of Microarrays) módszer segítségével.

EREDMÉNYEK

Eredményeimet két témakörbe csoportosítva - **BIOMARKER kutatás** és validáció, valamint a vastagbél-daganatok molekuláris folyamatainak **FUNKCIONÁLIS elemzése** - ismertetem. Röviden összefoglalva, mRNS- és fehérje-alapú biomarker azonosítást végeztem vastagbél-daganatokban microarray technológiával. A kapott eredményeket megerősítettem, majd összefüggéseket kerestem az mRNS és fehérje szintek között. Lézer mikrodisszekált minták bevonásával meghatároztam a vizsgált biomarkerek szövetspecifikus expresszióját. A lézer mikrodisszekált minták felhasználásával meghatároztam az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során csökkenő expressziót mutató gének listáját, amelyből meghatároztam a metilációs szabályozással összefüggésbe hozható gének csoportját. Szintén az adenoma-carcinoma szekvencia vizsgálatával azonosítottam azokat a géneket, amelyek expressziója a szelektív COX-2 gátlószeres kezeléssel reverzibilisen visszafordítható.

1. Expressziós változást mutató gének azonosítása vastagbél-daganatokban fehérje és mRNS szinten

a. Teljes genom szintű mRNS expressziós profil meghatározása

- A génexpressziós mintázat meghatározásához 6 Dukes D stádiumú tumor és 6 ép nyálkahártya mintából készült chiperedményeket használtam fel. A génszelekcióhoz SAM (Significance Analysis of Microarrays) módszert használtam. Kiválasztottam a top500 gént, amelyek kifejeződése leginkább változik az ép vs. tumor összehasonlításban. Összesen 199 csökkenő és 301 növekvő expressziójú gént azonosítottam és sejtfunkció alapján csoportosítottam.

b. Fehérje-alapú markerek azonosítása vastagbél-daganatokban ellenanyag microarray technológiával

- A tumoros és ép nyálkahártya minták között 67 szignifikánsan változó gént azonosítottam fehérje szinten. Ezeket a géntermékeket a funkcionális csoportosítás alapján apoptózis (5), sejtciklus szabályozás (7), transzkripció szabályozása (4), DNS másolás (6) és molekuláris transzport, sejtadhézió (45) sejtfunkció területére soroltam be.
- Dukes B csoportban 22 expressziós különbséget mutató gént találtam, amelyek szignifikáns változást mutattak fehérje szinten a makroszkóposan ép mucosához

viszonyítva. Ebből 9 csökkent, valamint 13 fokozott mértékben fejeződött ki az egészséges szövetben tapasztalható képest.

- Duker D csoportban 25 expressziós különbséget mutató gént találtam fehérje szinten. Ebből 13 gén kifejeződése csökkent, míg 12 gén fokozott működést mutatott az egészséges szövethez képest.
- A progressziós markerek azonosításához a Duker B és Duker D csoportok elkülönítése során 58 szignifikánsan megváltozott expressziójú gént azonosítottam, ebből 11 mutatott jelentősebb expressziós eltérést a két csoport között.
- TMA lemezekon végzett immunhisztokémiai módszerrel az APC, a Caveolin, a CBP, a ciklin-A, az ERK, a HSP60, a Cox2, az EGFR, a C-myc, a Cald, a Top1, a DARPP32, az MRE11A, az AndrogenR és az EPS8 ellenanyag microarray-vel azonosított fehérjéket validáltam.

2. mRNS és fehérje szint közötti összefüggések felderítése

- Az mRNS és fehérje szint közötti összefüggések keresésekor 143 transzkriptum és géntermék esetében sikerült kimutatnom pozitív korrelációt ($R^2 > 0,8$), elsősorban transzport fehérjék csoportjába tartozó fehérjék esetén. Ugyanakkor 95 mRNS és fehérje szinten ellentétesen változó gént is azonosítottam ($R^2 > 0,9$), amelyek főként a sejtfolyamatok szabályozásában érintettek.

3. Az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladtával expressziós változást mutató gének azonosítása lézer mikrokimetszett vastagbél-mintákból

- Munkám során 42 microarray-t készítettem, hat tumoros beteg hat különböző szövettani régiójának felhasználásával, amelyben 6 makroszkóposan ép nyálkahártya, 6 polip, 6 daganat háms- és stróma-régióját, valamint 3 ép és 3 nyiroktüsző területét vizsgáltam. Régióként 5000-10000 sejtet gyűjtöttem össze lézer mikrodisszekcióval.

a. Hám és stróma régió vizsgálata

- Elemzéseim során meghatároztam azt a 100 változást mutató (top100) gént, amely expressziója legnagyobb és legbiztosabb mértékben változik a tumor kialakulása során a hámban majd a strómában, melyeket 17 sejtfunkciós csoportba soroltam be.
- A gének közel negyedének (22 hámbeli, 23 strómabeli) még nem ismert funkciója és a genetikai útvonalakban betöltött szerepe. Az apoptózis (2,3) a proteolízis (3,3) a sejtváándorlás (2,2) és az ubiquitiniláció (1,1) mind a hámban, mind a strómában

jellemző folyamatok. A hámban azonban nem szerepel csontosodás és csontfejlődésért felelős gének működésének változása (0,7), míg a strómára jellemző endocitózis helyett exocitózis (1,1), az immunválasz gének helyett a stressz válasz (2,2) génjei azonosíthatók. Ezzel szemben a hámban intenzívebbnek mutatkozott a transzportfolyamatok (9,6) és a transzkripció szabályozása (20,6), valamint az anyagcsere, (10,3) és a sejtosztódás (5,2) génjeinek változása, amelyek a sejtproliferációt alátámasztó fokozott osztódásra és anyagcserére utalnak. Az érképződés (1,5), a jelátvitel mechanizmusok fokozódása (9,15) és az oxidációs-redukciós folyamatok megváltozása (0,2) a strómára jellemzőek. A többi sejt folyamat mint pl. a morfogenezis (5,7) a sejtadhézió (7,9) és a sejt vándorlás (2,2), közel azonos mértékűnek adódtak mindkét szöveti régióban.

- A kiválasztott 100-100 gén klaszter-elemzése és molekuláris mintázata alapján elmondható, hogy mind a hám, mind a stróma régiókban az ép és adenoma állapot jobban hasonlít egymáshoz, mint az adenoma és a tumor állapot.

b. Nyiroktüszők vizsgálata

- A Peyer-plakkok szerepe még nem teljesen tisztázott a vastagbél regenerációs és a tumor progressziós folyamatai során. Azonban irodalmi adatok alátámasztják, hogy ebben a régióban aktív sejt vándorlási és differenciációs folyamatok zajlanak. Munkám során nyiroktüszőkben 54 csökkenő és 21 fokozódó működésű gént azonosítottam az adenoma átalakuláshoz kapcsolódóan.

4. Metilációs szabályozás alatt álló gének azonosítása az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során a génexpresszió vizsgálata alapján.

- 110 olyan gént azonosítottam, amelyek kifejeződése az egészséges bélhámsejtekben intenzív, az adenoma hámsejtjeiben csökkenni kezd, majd a tumoros hámsejtekben még inkább mérséklődik vagy megszűnik. Ezzel párhuzamosan HT-29 colorectális adenokarcinoma sejtvonalat kezeltem 5-aza-2'-deoxicitidin demetilációs ágenssel. A kezelés hatására 71 olyan gént azonosítottam, amelyek kifejeződése legalább kétszeresére növekedett a demetilációs kezelés során ($p < 0,01$). A két lista 17 közös elemét RT-PCR technikával tovább vizsgáltam.

- SAM módszer segítségével meghatároztam a top100 csökkent működésű gént ép-adenoma, adenoma-tumor és ép-tumor összehasonlításokban. Az ép-adenoma összehasonlításban tapasztalt csökkenő kifejeződés nem egyértelműen a metiláció hatására alakul ki, hiszen a 100 kiválogatott génből a modellben mindössze 12 működése növekedett az 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatására. A metiláció által történő szabályozás a legnagyobb arányban, 55%-ban az ép és tumoros mintákból származó gének esetében igazolódott. Adenoma és tumor között 100 csökkent működésű transzkriptumból 32 esetében sikerült növekedést kimutatnom a modellben, ezzel igazolva ezek metilációval történő szabályozását vastagbél-daganatokban.

a. RT-PCR megerősítő vizsgálat szöveti mintákon

- Az ép-adenoma összehasonlítás eredményei alapján 15 gén kifejeződése csökkent, ezek többségének megnyilvánulása legalább felére esett vissza az RT-PCR mérési eredmények szerint. Az ép-tumor összehasonlítás eredményei alapján 11 gén működése mérséklődött a két állapot között. Az adenoma-tumor összehasonlítás esetében 6 olyan gént azonosítottam, amelyek kifejeződése tovább csökken a tumor malignizálódása során.

b. Fehérje szintű változások igazolása a PTGDR gén esetében

- Egy kiválasztott génen, a PTGDR génen további vizsgálatokat végeztem. Azért erre a génre esett a választásom, mert expressziójának csökkenését biopsziás mintákon is igazoltam, továbbá 5' szabályozó régiójában 3 CpG szigetet azonosítottam. Annak kiderítése érdekében, hogy a kérdéses gén valóban metilációs szabályozás alatt áll-e, biszulfid szekvenálást terveztem. Mindezek előtt megvizsgáltam, hogy fehérje szinten is érvényes-e az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladásával járó fehérje expresszió csökkenés. Vizsgálataim szerint, a PTGDR expressziója csökken a tumor progressziója során fehérje szinten is.

c. Biszulfid szekvenálás és HRM elemzés a PTGDR gén promóter régiójában

- A biszulfid szekvenálással kapott eredményeim szerint a PTGDR gén promóter régiójának CpG szigetei az ép nyálkahártya sejteiben alig, a tumoros hámban részlegesen, míg HT-29 adenokarcinoma sejtvonalban erőteljesen metiláltak. Az ép nyálkahártyából származó mintában (N2) a timin-csúcsok magas értéket mutatnak, jelezve a nem-metilált citozinok biszulfid konverzióját. A tumoros mintában (T2)

magasabb citozin értékeket találtam, különösen a 2-es, a 8-as, a 9-es, a 14-es, a 15-ös és 23-as CpG szigetekben. A HT-29 minta biszulfid-szekvenálása során csak nem konvertálódott citozineket találtam, ami erőteljes metilációra utal. A PTGDR gén promóter régiójának HRM elemzésével az ép és tumoros minták szintén elkülöníthetők.

5. COX-2-gátlás molekuláris mechanizmusának vizsgálata

- PAM módszer használatával olyan géneket kerestem, amelyek kifejeződése a betegség megjelenésével konzekvensen megváltozik, így ezek segítségével az ép és az adenoma, valamint az ép és a tumoros állapotok az expressziós mintázat alapján elkülöníthetők. Az ép és adenoma minták 20 gén, az ép és vastagbél-daganatos biopsziák 38 gén együttes expressziós mintázata alapján különíthetők el.
- A vizsgált 20, adenoma-specifickus gén közül - a HT-29 colon adenokarcinoma sejtekben az NS398 szelektív COX-2 gátlószeres kezelés hatására - 17 gén kifejeződésében ellentétes irányú változás mutatkozott. Ebből 14 esetében (köztük a fokozott működést mutató szomatosztatin, klaudin 8 és YY peptid, valamint a gátolt kadherin-3 és KIAA1199) a változás szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,05$).
- A 38 CRC-marker közül (mint például a karbon-anhidráz-7, az interleukin-8 és a melanoma sejtadhéziós molekula) 12 olyan gént azonosítottam, amelyek működését az NS398 kezelés ellentétes irányba változtatta.

a. A COX-2 fehérje szintű kifejeződésének vizsgálata

- A kontroll mintákban a COX-2-pozitív/összes sejt aránya 80,5% volt, míg a 10 μM NS398 kezelés hatására 77,0%-ra, a 25 μM kezelés hatására 61,2%-ra esett vissza. Az NS398 dózisének további emelése (100 μM) a pozitív sejtek arányában (53,1%) szignifikáns csökkenést eredményezett. A COX-2-pozitív sejtek esetében erős granuláris és/vagy diffúz citoplazmatikus immunfestés volt tapasztalható. Western-blot vizsgálatok alapján a COX-2 fehérje kifejeződésében jelentős csökkenés volt kimutatható a 96 órán át tartó 50, illetve 100 μM koncentrációban alkalmazott NS398 kezelés hatására. Fehérje szintű vizsgálataim alapján megállapítható, hogy az NS398 kezelés a COX-2 fehérje képződésének gátlásán keresztül fejt ki hatását.

b. Szövetspecifikus génműködés vizsgálata

- A lézer mikrokimetszett mintákban az adenoma-asszociált génextpressziós változások 65%-a a hámsejtekből származott, míg a CRC markerek 53%-a volt hámsejt eredetű.

KÖVETKEZTETÉSEK

Molekuláris biológiai eszközökkel folytatott vizsgálataim alapján a vastagbél-tumorerő sokkal inkább tekinthető szisztémás, mintsem lokális elváltozásoknak. A tumor, kialakulása majd fejlődése során, hatást gyakorol a környező sejtekre, szervekre, szervrendszerekre.

Nagy denzitású oligonukleotid microarray technológiával és a későbbiekben NGS alapú transzkriptum szekvenálással olyan mRNS molekulák azonosíthatók, amelyek diagnosztikus értékkel rendelkeznek. Az automatizált molekuláris diagnosztizáláson túlmenően nemcsak a szövettani besorolást elősegítő molekuláris patológiai csoportosításra nyílik lehetőség, hanem a terápiás válaszok előrejelzésére és az egyénre szabott terápiás lehetőségek megvalósítására is.

Az ellenanyag microarray technológia mint potenciális nagy áteresztőképességű (high-throughput) módszer alkalmas lehet fehérje szintű biomarkerek és diagnosztikus mintázatok azonosítására. A markerkombinációk azonosítása és a napi gyakorlatban történő felhasználása igen fontos feladat, ahol az ellenanyag microarray jelentős előrelépést jelenthet.

A chip-technológia fejlődésével lehetővé vált, hogy kis sejtszámú mintákból is megfelelően értékelhető teljes genom expressziós microarray-k készüljenek. Ez nagy szerepet játszik a genetikai hátterű betegségek megértésében. A technológia LCM-val kombinálva lehetővé teszi különböző szövettani régiók genomszintű expressziójának tanulmányozását. Ezáltal azonosítható, hogy milyen folyamatok mely szövettani régiókra jellemzők. A diagnosztikában szintén fontos szerepet kaphatnak ezek a „tisztá” feldúsított sejtpopulációból származó eredmények, expressziós mintázatok. A jelenlegi határ a néhány ezersejtes tartomány. Ez már elég kicsi mikrokörnyezet ahhoz, hogy egy szöveti régió pillanatnyi expressziós állapotáról pontos képet kapjunk. Azonban az igazi áttörést az jelentené, ha egyetlen sejt genomszintű génkifejeződése is tanulmányozhatóvá válna. Ennek jelenleg technikai korlátját az izolálási és amplifikációs lépések jelentik, amelynek megoldását a kutatók az új generációs szekvenálási eljárások alkalmazásától várják.

A gének kifejeződés vizsgálata alapján lehetőség nyílik olyan epigenetikai események felderítésére, mint amilyen a DNS metiláció. A DNS metiláció mértéke biszulfid szekvenálással és HRM elemzéssel megállapítható az ép és tumoros szövetekből egyaránt. Sejtkultúrából közel 100%-ban metilált régiók azonosíthatók, míg tumoros szövetből nem ennyire markáns, de határozott 20-25% körüli metiláltság mutatható ki. Ennek oka, hogy a szövet tumor/ép sejtaránya nem ismert, továbbá a hám és stróma sejtek más mértékben metilálódhatnak. Ennek kiderítése további feladatot jelent, mivel a lézermikrodisszekált minták mennyiségi korlátok miatt jelenleg nem alkalmasak biszulfid szekvenálásra.

Biopszia mintákból azonosíthatók a colorectális adenoma-dysplasia-carcinoma szekvencia előrehaladása során megváltozott működésű gének. Ezek között olyanok is találhatóak, amelyek az adenoma átalakulás során visszafordíthatók, vagyis kifejeződésük az egészséges szintre módosítható. Diagnosztikai szempontból fontos feladat további gének meghatározása, amelyek megnyilvánulása megváltozik az adenoma-carcinoma átalakulás során, valamint terápiás szempontból fontos lehet új hatóanyagok kifejlesztése és tesztelése.

LEGFONTOSABB ÚJ MEGFIGYELÉSEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK

□ a vastagbél műtéti minták, valamint ezek fagyasztott metszeteinek a lézer mikrodisszekált szövettani régióinak génexpressziós mintázata meghatározható és összehasonlítható teljes genom oligonukleotid microarray vizsgálatokkal. A lézer mikrokimetszett minták Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálata a minőségi kritériumoknak messzemenően megfelel, standardizáltak és jól reprodukálhatónak bizonyult.

□ a vastagbél-daganatok fejlődése során fehérje szintű diagnosztikus és prognosztikus fehérjemintázatok határozhatók meg ellenanyag microarray technológiával, amelyek elkülönítő ereje TMA lemezeken végzett immunhisztokémiai technológiával is igazolható.

□ az oligonukleotid és ellenanyag microarray mérések eredményei alapján a fehérje és az mRNS szint közötti összefüggések határozhatók meg vastagbél-daganatokban, amelyek más technológiákkal (RT-PCR, TMA immunhisztokémia) igazolhatók.

□ a microarray vizsgálatok eredményei más technológiák alkalmazásával is megerősíthetők, mind fehérje (TMA), mind mRNS (RT-PCR) szinten,

□ a génexpressziós eredmények alapján a vastagbél-betegségek patomechanizmusával összefüggő károsodott biológiai útvonalak azonosíthatók,

- lézer mikrokimetszett mintákon a vastagbél adenoma-dysplasia-carcinoma szekvencia előrehaladása során bekövetkező génexpressziós változások azonosítható, amelyek a colorectális karcinogenezis indikátorai lehetnek hám és stróma régiókban,
- a génexpresszió vizsgálata alapján metilációs szabályozás alatt álló gének azonosíthatók (pl. PTGDR) sejtkultúra modell és klinikai minták használatával,
- szelektív COX-2 gátlószer hatására az adenoma-carcinoma átmenetben szerepet játszó gének működése megfordítható az NS398 terápiás ágens alkalmazásával.

Az értekezés témájában, nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Galamb O, **Spisák S**, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. Br J Cancer. 2010;102(4):765-73. **IF: 4,346** (2009)

Spisák S, Galamb B, Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Tulassay Z, Molnár B. Applicability of antibody and mRNA expression microarrays for identifying diagnostic and progression markers of early and late stage colorectal cancer. Dis Markers, 2010;28(1):1-14. **IF: 2,026** (2009)

Spisák S, Guttman A. Biomedical applications of protein microarrays. Curr Med Chem. 2009;16(22):2806-15. **IF: 4,708**

Galamb O, Sipos F, **Spisák S**, Galamb B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Potential biomarkers of colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma progression: mRNA expression profiling and in situ protein detection on TMAs reveal 15 sequentially upregulated and 2 downregulated genes. Cell Oncol. 2009;31(1):19-29. **IF: 4,169**

Galamb O, Sipos F, Solymosi N, **Spisák S**, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z, Molnár B. Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(10):2835-45. **IF: 4,770**

Spisak S, Tulassay Z, Molnar B, Guttman A. Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. Electrophoresis. 2007 ;28(23):4261-73. **IF: 3,609**

Sipos F, Muzes G, Galamb O, **Spisak S**, Krenács T, Toth K, Tulassay Z, Molnar B. The possible role of isolated lymphoid follicles in colonic mucosal repair. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(1):11-8. **IF: 1,152** (2009)

A dolgozat témájában, hazai tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Spisák S, Kalmár A, Galamb O, Sipos F, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z. Identification of methylation related genes from laser capture microdissected colon samples during investigation of adenoma-carcinoma sequence *Orv Hetil.* 2010;151(20):805-14.

Spisák S, Galamb B, Wichmann B, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Nemes B, Tulassay Z, Molnár B. *Orv Hetil.* Tissue microarray (TMA) validated progression markers in colorectal cancer using antibody microarrays. 2009;150(34):1607-13.

Spisák S, Molnár B, Galamb O, Sipos F, Tulassay Z. Fehérje chipek elméleti alapjai és alkalmazási lehetőségük az orvosi diagnosztikában és kutatásban. *Orv Hetil.* 2007; 148(32):1511-20.

Más témában, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Tóth K, Galamb O, **Spisák S**, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z. The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res.* 2010 (nyomtatásban). **IF: 1,152** (2009)

Szoke D, Molnar B, Solymosi N, Racz K, Gergics P, Blasko B, Vasarhelyi B, Vannay A, Mandy Y, Klausz G, Gyulai Z, Galamb O, **Spisak S**, Hutkai B, Somogyi A, Berta K, Szabo A, Tulassay T, Tulassay Z. Polymorphisms of the ApoE, HSD3B1, IL-1beta and p53 genes are associated with the development of early uremic complications in diabetic patients: Results of a DNA resequencing array study. *Int J Mol Med.* 2009;23(2):217-27. **IF: 1,980**

Galamb O, Györffy B, Sipos F, **Spisák S**, Németh AM, Miheller P, Tulassay Z, Dinya E, Molnár B. Inflammation, adenoma and cancer: objective classification of colon biopsy specimens with gene expression signature. *Dis Markers.* 2008;25(1):1-16. **IF: 2,303**

Galamb O, Györffy B, Sipos F, Dinya E, Krenács T, Berczi L, Szőke D, **Spisák S**, Solymosi N, Németh AM, Juhász M, Molnár B, Tulassay Z. Helicobacter pylori and antrum erosion specific gene expression patterns: the discriminative role of CXCL13 and VCAM1 transcripts. *Helicobacter.* 2008;13(2):112-26. **IF: 2,470**

Galamb O, Sipos F, Molnár B, Szőke D, **Spisák S**, Tulassay Z. Evaluation of malignant and benign gastric biopsy specimens by mRNA expression profile and multivariate statistical methods. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007 Sep;72(5):299-309. **IF: 2,307**

Galamb O, Sipos F, Dinya E, **Spisák S**, Tulassay Z, Molnár B. mRNA expression, functional profiling and multivariate classification of colon biopsy specimen by cDNA overall glass microarray. *World J Gastroenterol.* 2006;12(43):6998-7006.

Más témában, magyar nyelven megjelent közlemények

Valcz G, Sipos F, Krenács T, **Spisák S**, Tóth K, Molnár B, Tulassay Z. Az őssejtek jellemzése, mozgása és terápiás lehetőségei a humán vastagbélben. *Magy. Belorv. Arch.* 2009;4:272-278.

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, **Spisák S**, Tóth K, Valcz G, Kalmár A, Múzes G, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. Az öregedés jelei az emésztőrendszerben. *Magy Belorv Arch.* 2010;63:19-24.

Tóth K, Galamb O, **Spisák S**, Wichmann B, Sipos F, Leiszter K, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. Free circulating DNA based colorectal cancer screening from peripheral blood: the possibility of the methylated septin 9 gene marker *Orv Hetil.* 2009;150(21):969-77.

Galamb O, Sipos F, Dinya E, **Spisák S**, Somorácz A, Molnár B, Tulassay Z. Vastagbél-biopszia funkcionális mRNS-expressziós vizsgálata és osztályozása általános cDNS microarray technikával. *Orv Hetil.* 2008;149(5):219-32.

Galamb O, Gyórfy B, Sipos F, **Spisák S**, Németh AM, Miheller P, Dinya E, Molnár B, Tulassay Z. Vastagbél-adenoma, vastagbélrák és IBD-specifikus génexpressziós mintázatok meghatározása teljes genom szintű oligonukleotid microarray-rendszerrel. *Orv Hetil.* 2007;148(44):2067-79. **Markusovszky díj 2008**

Tóth K, Galamb O, Hevér-Pálfy T, Solymosi N, Miheller P, Müllner K, **Spisák S**, Sipos F, Molnár B, Tulassay Z. Vastagbél betegségben szenvedők perifériás vérének mRNS expressziós vizsgálata. *Magy Belorv Arch.* 2007; 60:531–539.

Szoke D, Sipos F, **Spisak S**, Molnar B, Tulassay Z. A p53 gén és fehérje 2005-ben: új eredmények, ígéretes lehetőségek. *Orv Hetil,* 2005;146(30):1587-94.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik segítettek PhD munkám elkészítését:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, és témavezetőmnek, Dr. Molnár Béla tudományos főmunkatársnak, hogy lehetővé tették és támogatták Ph.D. munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;
 - Udvardyné Dr. Galamb Orsolya szakmai támogatásáért és barátságáért;
 - Dr. Mihály Emese és Dr. Igaz Péter házi opponenseimnek Ph.D. dolgozatom alapos áttekintéséért;
 - Dr. Krenács Tibornak szakmai és a szöveti microarray vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
 - Dr. Berczi Lajos egyetemi adjunktusnak a személyes konzultációk során nyújtott értékes és hasznos tanácsaiért;
 - Dr. Solymosi Norbertnek a bioinformatikai elemzések professzionális kivitelezéséért;
 - Csorba Gézánné Marica szakasszisztensnek a gyakorlati munkámban nyújtott segítségéért;
 - a Sejtanalitika Laboratórium összes dolgozójának támogatásukért;
- Végül, de nem utolsósorban köszönöm Családomnak, hogy mindenben mellettem álltak és állnak.