### A DNS metiláció szerepe a vastagbélrák kialakulásában

Doktori értekezés

### dr. Patai Árpád

Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Rakonczay Zoltán, az MTA doktora, egyetemi tanár Dr. Bödör Csaba, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga elnöke: Dr. Arató András, az MTA doktora, egyetemi tanár Komplex vizsga bizottság tagjai: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus Dr. Szabó László, Ph.D., főiskolai tanár Dr. Tulassay Tivadar, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Budapest 2018

### TARTALOMJEGYZÉK

T/	ARTA	LOMJEGYZÉK	1
1.	RÖ	VIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2.	BEV	/EZETÉS	7
	2.1.	A vastag- és végbélrák epidemiológiája	7
	2.2.	A vastag- és végbélrák molekuláris patogenezise, 3 fő útvonala	8
	2.2.1.	Kromoszóma-instabilitással rendelkező alcsoport (chromosome instable neoplas	sia,
	CIN) -	- genetikai mutációk	8
	2.2.2.	CpG-sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype, CIMP) – DN	IS-
	metilá	ció	9
	2.2.3.	Mikroszatellita-instabilitást hordozó alcsoport (microsatellite instable, MSI)	11
	2.3.	Wnt-jelátviteli útvonal szerepe a CRC molekuláris patogenezisében	11
	2.4.	Vastagbél adenomák	12
	2.4.1.	Hagyományos vastagbél adenomák	12
	2.4.2.1	. Hiperplasztikus polipok	14
	2.4.2.2	2. Szesszilis fogazott adenoma (sessile serrated adenoma, SSA)	15
	2.4.2.3	B. Tradicionális fogazott adenoma (traditional serrated adenoma, TSA)	19
	2.5. H	áttérjelenség (field effect, field cancerization): DNS-metiláció jelenléte a tumor	
	mellet	ti egészséges nyálkahártyában	20
3.	CÉI	KITŰZÉSEK	21
4.	MÓ	DSZEREK	22
	4.1.	Betegek és mintagyűjtés	22
	4.2.	Etikai engedélyek	23
	4.3.	DNS-metiláció szenzitív restrikciós enzim array vizsgálat (Methyl Profiler)	23
	4.4.	DNS-metiláció specifikus (biszulfit) PCR-vizsgálat, olvadáspont elemzés	29
	4.5.	RNS-izolálás és teljes genom mRNS-expresszió microarray vizsgálat	30
	4.6.	Mismatch repair (MMR) fehérjék (MSI státusz) és SFRP1 immunhisztokémiai	
	vizsgá	lata	30
	4.7.	A miofibroblasztok SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1)-termelésének	
	vizsgá	lata	31
	4.8.	Demetilációs kísérletek sejtkultúra modellben	31
	4.9.	BRAF és KRAS mutációk vizsgálata	32

	4.10.	Mutációs eltérések vizsgálata új generációs szekvenálással	. 33
	4.11.	Statisztikai elemzés	. 34
5	. ERI	EDMÉNYEK	. 35
	5.1.	Jó- és rosszindulatú vastagbéldaganatok metilációs mintázatának összehasonlítása	ı 35
	5.2.	DNS-metilációs eltérést mutató gének validációja	. 42
	5.3.	Colitis ulcerosás minták DNS-metilációs vizsgálata45	
	5.4.	DNS-metiláció, mRNS- és fehérjekifejeződés kapcsolatának vizsgálata	. 45
	5.5.	KRAS és BRAF mutációinak és a mikroszatellita státusz vizsgálata	.47
	5.6.	12 génes mutációs panel vizsgálata az adenoma-karcinóma szekvencia során és	
	sessili	s fogazott adenomákban	. 47
	5.7.	Fogazott polipok DNS-metilációs array vizsgálata	. 48
	5.8.	A MutL homolog 1- (MLH1) és a secreted frizzled-related protein 1- (SFRP1)	
	fehérj	e expressziójának vizsgálata fogazott polipokban	. 49
	5.9.	Fogazott polipok mutációvizsgálata	. 51
	5.10.	A secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) mRNS-expresszió változása a CR	C
	és NA	T szövetben	. 51
	5.11.	A miofibroblasztok secreted frizzled-related protein 1- (SFRP1-)termelésének	
	vizsgá	lata normális, daganathoz közeli ép (NAT) és vastagbélrákos (CRC) mintákban	. 53
	5.12.	A secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) promóter hipermetiláció vizsgálat	ta a
	NAT	és a CRC területeken	. 55
	5.13.	Demetilációs kezelés hatása a metilált gének kifejeződésére	. 57
6	. ME	GBESZÉLÉS	. 60
	6.1.	DNS-metiláció vizsgálata az adenoma-karcinóma szekvencia során	. 60
	6.2.	DNS-metiláció vizsgálata colitis ulcerosában	. 64
	6.3.	Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) gén- és fehérjeexpresszió	
	összeł	nasonlítása és a vizsgálata a háttérjelenségben (field effectben)	. 65
	6.4.	DNS-metiláció vizsgálata fogazott polipokban	. 66
	6.5.	Mutációk és hipermetilált gének gyakoriságának összehasonlítása	. 67
	6.6.	Demetiláló kezelés és kezdeti klinikai eredmények szolid tumorokban	. 67
	6.7.	DNS-metiláció klinikai alkalmazásának lehetőségei a vastagbélrákban: pre-	
	screen	ing, prognózis, predikció (3P)	. 68
7	. KÖ	VETKEZTETÉSEK	.72
8	. ÖSS	SZEFOGLALÁS	.73
9	. SUI	MMARY	.74

10. LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	75
11. IRODALOMJEGYZÉK	76
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	92
12.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	92
12.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények	94
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96
14. FÜGGELÉK	98

### 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACF	aberráns kripta fókusz (microadenoma)
ACS	adenoma-carcinoma szekvencia (adenoma-carcinoma sequence)
ANOVA	varianciaanalízis (ANalysis Of VAriance)
APC	adenomatosus polyposis coli (tumorszuppresszor gén)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikai Sejtkultúra Adatbázis)
AZA	5-aza-2'-deoxicitidin (demetiláló szer)
bp	bázispár
BRAF	B-raf (onkogén)
CIMP	CpG-sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype)
CIMP-H	CpG-sziget metilátor fenotípus nagyfokú metilációval
CIMP-L	CpG-sziget metilátor fenotípus kisfokú metilációval
CIN	Kromoszóma-instabil daganat
CN	vastagbélráktól >10 cm-re vett szövetminta (cancer normal)
COBRA	Combined bisulfite restriction analysis (metilációs vizsgálat)
CpG	citozin-guanin dinukleotid
CRC	vastag- és végbélrák (kolorektális karcinóma, colorectal cancer)
cRNS	komplementer RNS
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (médium sejtkultúrához)
DNMT	DNS metil transzferáz
F	vastagbélráktól <2 cm-re vett szövetminta (field)
FACS	fluorescence-activated cell sorter (fluoreszcencia aktiválta sejtválogatás)
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal chicken serum
GCHP	kehelysejtben gazdag hiperplasztikus polip
GEO	Gene Expression Omnibus (génexpressziós adatbázis)
GSE	Gene Expression Omnibus Series
HCT116	vastagbélrák sejtvonal
HGD	high-grade dysplasiát tartalmazó adenoma
HRM	high-resolution melting curve (nagy felbontású olvadáspont elemzés)
HT29	vastagbélrák sejtvonal
IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7 (tumorszuppresszor gén)
KRAS	Kirsten ras viral oncogene (onkogén)

LCM	laser capture microdissection (lézer mikrodisszekció)		
LGD	low-grade dysplasiát tartalmazó adenoma		
MAPK/ERK	mitogen-activated protein kinases; eredetileg ERK: extracellular signal-		
	regulated kinases (jelátviteli útvonal)		
MCRC	távoli áttétet adó, IV. stádiumú vastag- és végbélrák		
MDS	mielodiszpláziás szindróma		
met	metilált		
MGMT	O-6-metilguanin-DNS metiltranszferáz		
MLH1	MutL homolog 1 (hibajavító gén és fehérje)		
MMR	mismatch repair (hibajavító gének és fehérjék, pl. MLH1)		
MSI	mikroszatellita-instabil daganat		
MSI-H	nagyfokú mikroszatellita instabilitás		
MSI-L	kisfokú mikroszatellita instabilitás		
MSP	metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (metilációs vizsgálat)		
MSS	mikroszatellita-stabil		
mut	mutált		
MVHP	mikrovezikuláris hiperplasztikus polip		
Ν	ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél idősebb felnőttből (normal adult)		
NAT	normal adjacent tumor (tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület)		
nm	nem metilált		
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)		
PS	piroszekvenálás		
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz		
	polimorfizmus)		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (médium sejtkultúrához)		
SAH	S-adenozil homocisztein		
SAM	S-adenozil metionin		
SD	standard deviáció, szórás		
SDC2	Syndecan 2 (sejtmembrán fehérje)		
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (amerikai rákregiszter)		
SFRP	secreted frizzled-related protein (Wnt jelátviteli útvonal tagja)		
SSA	sessilis serrated adenoma		
SSL	sessilis serrated lézió		
SSP	sessilis serrated polip		

TA	transitional area (daganat és ép szövet közötti átmeneti terület)
TET	ten-eleven translocation metilcitozin dioxigenáz (demetiláló enzim)
TMA	tissue microarray (szöveti microarray)
TSA	tradicionális serrated adenoma
UCa	szövettanilag aktív colitis ulcerosás szövetminta
UCi	szövettanilag inaktív colitis ulcerosás szövetminta
UC-CRC	colitis ulcerosához társult vastag- és végbélrák
Wnt	Wingless-related integration site (jelátviteli útvonal)
wt	vad típus (wild type)
Y	ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél fiatalabb gyerekből (young)

A rövidítésjegyzék kizárólag a dolgozatban gyakrabban előforduló géneket tartalmazza; a munkában ritkábban szereplő génnevek feloldása a 4. táblázatban található.

Az idegen eredetű szavak helyesírásával kapcsolatban a házi opponensek útmutatásainak megfelelően a magyar helyesírást követtem.

#### 2. BEVEZETÉS

#### 2.1. A vastag- és végbélrák epidemiológiája

A vastag- és végbélrák (colorectalis adenocarcinoma, CRC) az évente felfedezett 1,4 millió új esettel a harmadik leggyakoribb rosszindulatú daganat a világon, ami évi közel 700 000 halálesethez vezet (Torre és mtsai 2017). Élettartam-kockázata férfiakban 4,7%, nőkben 4,4% (SEER adatbázis 2017). Bár a legtöbb fejlett országban a CRC incidenciája stagnál vagy csökken (Siegel és mtsai 2017), Magyarországon továbbra is enyhe növekvő tendenciát mutat (Nemzeti Rákregiszter 2017, 1. ábra). A CRC prognózisa az elmúlt évtizedekben folyamatosan javul, az ötéves túlélés Nyugat-Európában és Észak-Amerikában eléri a 65%-ot, hazánkban azonban 50 % alatt van (Miller és mtsai 2016). A túlélést befolyásoló legfontosabb prognosztikai tényező a CRC stádiuma (Függelék, 1. táblázat) a diagnózis felállításakor: korai stádiumban (lokalizált daganat, az esetek 39%-a) az ötéves túlélés 90%, míg távoli metasztázisokkal járó, IV. stádiumú, előrehaladott esetekben csak 12 % (Miller és mtsai 2017).



1. ábra: A vastagbélrák incidenciája Magyarországon 2000-2014 között enyhe emelkedést mutat a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján (Nemzeti Rákregiszter).

#### 2.2. A vastag- és végbélrák molekuláris patogenezise, 3 fő útvonala

Az elmúlt évtizedekben zajló intenzív kutatás egyértelműen bebizonyította, hogy a CRC nem egységes betegség, hanem különböző molekuláris háttérrel és klinikopatológiai eltérésekkel jellemezhető altípusok összessége. Az eltérő útvonalakon kialakuló CRC-k prognózisa, valamint a kezelésre adott válasza különböző (Sadamandam és mtsai 2013). Ezekből a megfigyelésekből kiindulva genetikai, majd epigenetikai vizsgálatokkal a CRC-t molekuláris biológiai szempontból három alcsoportba sorolták be.

### 2.2.1. Kromoszóma-instabilitással rendelkező alcsoport (chromosome instable neoplasia, CIN) – genetikai mutációk

A CRC-k kb. 80-85%-a az ún. adenoma-karcinóma szekvencia (ACS) során alakul ki. Az ACS folyamán az egymást követő genetikai mutációk hatására az egészséges nyálkahártyából rákmegelőző állapotokon, egyre súlyosbodó, low, majd high-grade stádiumba sorolt diszplasztikus elváltozásokat tartalmazó adenomákon keresztül invazív, rosszindulatú daganat alakul ki (2. ábra). Ennek értelmében tumorszuppresszor gének (például APC, SMAD4 és TP53) inaktiváló, valamint onkogének (például KRAS, PIK3CA) aktiváló mutációja felelős a daganat kialakulásáért. A többlépcsős folyamat egyik első eltérése az APC gén mutációja, amely az adenomák több mint 70%-ában megtalálható (Cancer Genome Atlas Network 2012). A folyamat későbbi stádiumaiban további mutációk (KRAS onkogén aktiváló mutáció, TP53 tumorszuppresszor gén inaktiváló mutációi stb.) is előfordulnak (Fearon 2011). Ezeket a jellegzetes genetikai mutációkat sokszor kromoszómaszám-eltérések (aneuploida) kísérik, ezért ezt az útvonalat kromoszóma-instabilnak (chromosome instable neoplasia, CIN) is nevezik. A CIN-re jellemző alapvető genetikai eltéréseket először 1988-ban Vogelstein és mtsai írták le (Vogelstein és mtsai 1988). Az utóbbi években publikált, a teljes kódoló genomot felölelő exom szekvenálásos vizsgálatok eredményeképpen számos új gén (például ARID1A, SOX9 és FAM123B) mutációját is megfigyelték (Greenman és mtsai 2007, Cancer Genome Atlas Network 2012). Ezek a vizsgálatok arra is felhívták a figyelmet, hogy bár a CRC genomjában több száz (úgynevezett "passenger" vagy "bystander") mutáció is előfordulhat, az adott daganatokban funkcionálisan csak néhány úgynevezett "driver" gén hozható kapcsolatba a daganat kialakulásával (Sjoblom és mtsai 2006).



 ábra: A vastagbélrák kialakulásának adenoma-karcinóma modellje (Markowitz és Bertagnolli, 2009 alapján Patai és Patai, 2017 után). Részletes magyarázat a szövegben található.

# 2.2.2. CpG-sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype, CIMP) – DNS-metiláció

A genetikai mutációknál nagyságrendnyivel nagyobb számban fordulnak elő epigenetikai eltérések CRC-ben (Schuebel és mtsai 2007). Az epigenetika olyan molekuláris eltérések összessége, amelyek megváltoztatják a gének expresszióját, anélkül hogy a DNS-szekvencia megváltozna. Ezek közül a legjobban a DNS-metilációs eltérések ismertek, amely során egy metilcsoport adódik a DNS-hez. A DNS- (adenozin vagy citozin) metilációt már prokariótákban is leírták, itt elsősorban az idegen DNS-től (pl. bakteriofág) való megkülönböztetésben és védekezésben van szerepe (Palmer és Marinus 1994). Eukariótákban a DNS-metiláció a transzkripció gátlásán keresztül fontos szerepet játszik többek között az embrionális fejlődésben, a transzpozonok és az X kromoszóma inaktivációjában, a genomiális imprintingben. Emberben a metilcsoport a DNS citozin- és guanin-dinukleotidokban gazdag, úgynevezett CpG-szigetekben elhelyezkedő citozin nukleotidok 5. szénatomjához kapcsolódik kovalensen, amelyet a DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimcsalád katalizál (3.

ábra). Az egészséges humán genomban kb 25 000 CpG-sziget található, amelynek 50%-a a gének szabályozó, promóter régiójában fordul elő (az összes gén 60-70%-a tartozik ide), és egészséges körülmények között, a genomikus régiókkal (kb. 25%) ellentétben, ezek a metilációtól védve vannak, nem metiláltak (Bird 1992). A daganatkialakulás során a genomikus régiók (géntest) hipometiláción mennek keresztül (globális hipometiláció), míg a promóter régiókban hipermetiláció jöhet létre, általában (és a dolgozat további részében) utóbbit nevezzük röviden DNS-metilációnak. Ez a transzkripciós faktorok kiszorításán, valamint egyéb kromatin remodelling fehérjék, pl. hiszton-deacetiláz odavonzásán keresztül a kromatin kompaktálódását (heterokromatin), inaktiválódását okozza. Ha ez tumorszuppresszor gének promóterében következik be, akkor az a genetikai mutációkhoz hasonlóan az adott gén elcsendesítéséhez, kieséséhez, ezáltal a daganat kialakulásához vezethet (Jones és Baylin 2002).



3. ábra. A DNS-metiláció folyamatát a DNS-metiltranszferázok (DNMT) katalizálják, amely során a metildonor S-adenozil-metioninból (SAM) a metilcsoport a citozin pirimidingyűrűjének 5' szénatomjára kerül. A reakciót DNMT-gátlókkal (pl. 5-aza-2'deoxicitidin) lehet meggátolni. SAH = S-adenozil-homocisztein. (Patai és mtsai 2012 után módosítva)

A DNS-demetilációja történhet passzívan deamináció útján, amikor az 5-metilcitozin timinné alakul (amely sokkal gyakrabban bekövetkezik, mint a citozin-uracil átalakulás). Ez a mutációk 30%-ban előfordul, annak ellenére hogy az 5-metilcitozin az emberi genom mindössze 1%-át alkotja (Shen és mtsai 1994).

Az aktív demetiláció a TET (ten-eleven translocation metilcitozin dioxigenáz) enzimek segítségével történik, amely során 5-metil-citozinból 5-hidroximetil-citozin képződik. Az aktív demetilációnak is fontos szerepe van a génexpresszió szabályozásában, de pontos szerepe még nem kellően tisztázott (Kohli és Zhang 2013).

1999-ben Toyota és munkatársai megfigyelték, hogy egyes vastagbélrákok nagyobb gyakorisággal tartalmaznak DNS-metilációt, ezt az altípust CpG-sziget metilátor fenotípusnak (CpG island methylator phenotype, CIMP) nevezték el (Toyota és mtsai 1999). A CIMP-pozitív vastagbéldaganatokra az idősebb kor és a női dominancia jellemző, gyakoriságuk fordítottan arányos a CIN-pozitív vastagbéldaganatokkal (Goel és mtsai 2007).

#### 2.2.3. Mikroszatellita-instabilitást hordozó alcsoport (microsatellite instable, MSI)

A harmadik, úgynevezett mikroszatellita instabilitást hordozó (MSI) alcsoportba a vastagbélrákos esetek 10-20%-a tartozik, erre a DNS-replikáció során fellépő hibák kijavítását végző (mismatch repair, MMR) enzimrendszer funkcionális kiesése jellemző (Boland és Goel 2010). Ennek hátterében sporadikus daganatokban ezeknek a géneknek (például *MLH1*) a hipermetilációja áll, így a sporadikus MSI daganatok egy része a CIMP alcsoport részének is tekinthető. Öröklődő formában előforduló MSI daganatok (Lynch-szindróma vagy régi nevén herediter nem polyposisos colorectalis carcinoma, HNPCC) kialakulásáért a fenti gének csírasejtes mutációi felelősek (Boland és Goel 2010). Klinikai szempontból fontos kiemelni, hogy az MSI és a mikroszatellita stabil (MSS) daganatok prognózisa között minden stádiumban különbség mutatható ki az MSI daganatok javára (Merok és mtsai 2013). Ez II-es stádiumú (nyirokcsomó áttéttel nem rendelkező) vastagbéldaganatok között olyan jelentős, hogy MSI-H megléte esetén nem javasolt kemoterápia a sebészeti kezelés kiegészítéseként.

#### 2.3. Wnt-jelátviteli útvonal szerepe a CRC molekuláris patogenezisében

A Wnt-jelátviteli útvonal fiziológiás funkciói (embrionális fejlődés, szöveti homeosztázis fenntartása) mellett kulcsfontosságú szerepet tölt be CRC kialakulásában (Nusse és Clevers 2017). A Wnt-k olyan szecernált glikoproteinek, amelyek többek között részt vesznek a sejtdifferenciációban, a proliferációban, a migrációban, a sejtpolaritás kialakításában és az őssejtmegújulásban (Nusse és Clevers 2017). A Wnt-k Frizzled transzmembrán receptorhoz kötődnek, amelyek különböző receptorokkal (pl. LRP5, LRP6) együtt sejtfelszíni komplexet alkotnak, amely hatására a citoplazmában található foszfoprotein Dsh sejtmembránba kerül. A

legjobban tanulmányozott, kanonikus β-catenin útvonalon keresztül bekapcsolt állapotban a β-catenin a citoplazmából a sejtmagba transzlokálódik, és különböző transzkripciós faktorok (TCF/LEF) segítségével számos célgén transzkripcióját indítja be (Niehrs 2012). A Wnt hiányában (kikapcsolt állapot) a β-catenin nem tud felhalmozódni a citoplazmában, az ún. degradációs komplexben marad és ubikvitinálódik. Az SFRP-k (secreted frizzled-related protein) extracelluláris fehérjék a Wnt-ligandokhoz kötődve, megakadályozzák azok kapcsolódását a Frizzled transzmembrán receptorhoz, ezáltal a Wnt-útvonal antagonistái, azt kikapcsolt állapotban tartják (Rubin és mtsai 2006). Ezzel ellentétben DNS-metilációjuk esetén a Wnt-útvonal kóros aktiválódásához, daganat kialakulásához vezethetnek (Suzuki és mtsai 2002).

#### 2.4. Vastagbél adenomák

A CRC kialakulását megelőző mirigyhámból kialakuló jóindulatú, de malignizálódásra potenciálisan hajlamos (tehát neoplasztikus) szövetszaporulatokat szövettanilag adenomáknak nevezzük. Gyakori makroszkópos (nyeles, pedunkuláris) megjelenésük miatt (bár lapos polip is ismert) az orvosi köznyelvben a jóindulatú vastagelváltozásokra összefoglalóan a polip elnevezést használjuk, amely magában foglalja a nem malignizálódó egyéb (pl. hamartomatózus) polipokat is. A fent részletezett *Vogelstein* és munkatársai által közel három évtizede leírt, a többlépcsős daganatképződés modelljének tekintett adenoma-karcinóma modell értelmében a vastagbélrák kizárólagos rákmegelőző állapotai az adenomatózus polipok voltak (Vogelstein és mtsai 1988). A hiperplasztikus (vagy más néven metaplasztikus) polipokat egészen a közelmúltig banális, onkológiai szempontból ártatlan eltéréseknek tartották. Az utóbbi évtizedben logaritmikusan növekvő számú vizsgálat azonban egyértelműen bebizonyította, hogy a "fogazott polipok" gyűjtőnév alatt összefoglalt eltérésekből is kialakulhat CRC (Snover 2011).

#### 2.4.1. Hagyományos vastagbél adenomák

Szövettanilag a hagyományos adenomákat három csoportra osztjuk. A leggyakrabban előforduló, de a legkisebb malignitási potenciállal rendelkező tubuláris adenomák döntően (>75%) tubulusokból állnak. A 25% és 75% között villózus elemeket tartalmazó adenomákat tubulovillózusnak nevezzük, míg a 75%-nál több villózus elemet tartalmazó, legnagyobb eséllyel rosszindulatúvá fajuló adenomákat pedig villózusnak hívjuk (Strum 2016). Az

adenomákat méretük alapján három csoportba soroljuk: apró (diminutive, 1-5 mm között), kis (6-9 mm) és nagy (10 mm vagy efölötti). Előrehaladott adenomáról beszélünk, ha 10 mm-nél nagyobb vagy ha 10 mm-nél kisebb, de legalább 25%-ban villózus elemeket vagy high-grade diszpláziát tartalmaz. Az adenoma malignus átalakulásának az egyik legfontosabb prediktív markere a mérete, ami ugyanakkor nem zárja ki, hogy akár 5 mm-nél kisebb adenomából nem alakulhatna ki karcinóma (Strum 2016). Az 1. táblázatban Strum (Strum 2016) nyomán mutatom be az adenomák méretének és a karcinóma előfordulásásának gyakoriságának az összefüggéseit.

1. táblázat. Az adenomák méret szerinti osztályozása (Strum 2016 alapján)

	Apró	Kis	Nagy
Méret	$\leq$ 5 mm	6-9 mm	≥10 mm
Előfordulás	45-70%	20%	10-20%
Előrehaladott adenoma	7-15%	10-35%	35-55%
Karcinóma	0,05%	0,2%	3-10%

#### 2.4.2. Fogazott polipok

A fogazott polip alatt a WHO jelenlegi beosztása (Snover és mtsai 2010) szerint 3 altípust különböztetünk meg: 1. a hiperplasztikus polipokat, 2. a hagyományos fogazott adenomákat (traditional serrated adenoma, TSA), valamint 3. a szesszilis fogazott adenomákat (sessile serrated adenoma, SSA).

A fogazott adenoma kifejezést 1990-ben használták először, amikor 18 000 vastagbél polip retrospektív újraelemzésekor 110 (0,6%) fogazott adenomát azonosítottak (Longacre 1990 és Fenoglio-Preiser), majd 2003-ban a fogazott polipokon belül 2 alcsoportot határoztak meg (Torlakovic és mtsai 2003). Az eredetileg leírt fogazott adenomát hagyományos fogazott adenomának (traditional serrated adenoma, TSA) nevezték el, és bevezették a szesszilis fogazott adenoma (sessile serrated adenoma, SSA) kategóriát olyan fogazott polipokra, amelyekben citológiai diszplázia nem volt azonosítható. A diszplázia hiánya miatt az SSA elnevezést sokszor kritika éri, hiszen az adenoma *per definitionem* diszpláziát kell, hogy tartalmazzon (low-grade és high-grade). Emiatt egyes szerzők a szesszilis fogazott lézió (SSL) vagy polip (SSP) kifejezést javasolják, amely azonban a gyakorlatban még nem terjedt el, ezért dolgozatomban a szesszilis fogazott adenoma elnevezést alkalmaztam.

A fogazott polipok általános szövettani jellemzője a kripta-epitelium inverziója, amely hosszmetszeti képen jellegzetes fűrészfogszerű, keresztmetszeti képen csillag alakú képet mutat (O'Brien 2007) (4. ábra). Ennek molekuláris hátterében *BRAF* vagy *KRAS* mutáció indukálta MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases; eredetileg ERK: extracellular signal-regulated kinases) útvonal által okozott csökkent apoptózis áll, amely a sejtek felhalmozódásához, jellegzetes fűrészfogmintázat kialakulásához vezet (Snover 2011).





 ábra. A fogazott polipok jellegzetes szövettani képe. Keresztmetszeti képen csillag alakú, hosszmetszeti képen jellegzetes fűrészfogszerű (serrated, serratios) kép. Hematoxilin-eozin festés, 40x nagyítás. (Patai és mtsai 2014)

#### 2.4.2.1. Hiperplasztikus polipok

Hiperplasztikus polipok (HP) a leggyakoribb (80-90%) és a legjobban jellemzett fogazott polipok, túlnyomóan a szigmában és a végbélben fordulnak elő. A nyálkahártyából alig emelkednek ki, általában 5 mm-nél kisebb átmérőjűek. Szövettanilag megnyúlt kripták jellemzőek, amelyek a lamina muscularis mucosánál, a bázisokon szűkek, a fogazottság csak a felszín felé, a hám felső harmadára korlátozódik, citológiai diszplázia nem fordul elő (Aust és Barreton 2010) (5. ábra). A proliferatív zóna kiszélesedhet, de a bazális réteget nem haladja meg. A sejtmagok kicsik, egyformák, bazálisan helyezkednek el, a citoplazma eozinofil. Ha a felszíni hám nem elérhető a szövettani vizsgálatkor, akkor a megvastagodott bazális membrán és a mukozába benyúló simaizom nyúlványok ("fésűszerű" rajzolat) segíthetnek a helyes diagnózis felállításában (Torlakovic és mtsai 2003).

A HP-ok általában az 50-60 éves korosztályban, az adenomatózus polipoknál egy évtizeddel korábban fordulnak elő (Morimoto és mtsai 2003). Kockázati tényezők közé a dohányzás, az alkoholfogyasztás, az elhízás és az alacsony folsavbevitel tartozik, míg a rendszeres nem szteroid gyulladásgátló szedés, a hormonpótló kezelés és a fokozott kálcium bevitel csökkenti a kialakulás kockázatát (Kearney és mtsai 1995, Morimoto és mtsai 2003).



5. ábra. Hiperplasztikus polip jellegzetes szövettani képe. Jellemzőek a megnyúlt kripták, amelyek a lamina muscularis mucosánál, a bázisokon szűkek, a felszín felé (hám felső harmadában) fogazottá válnak. Citológiai diszplázia nincsen. Hematoxilin-eozin festés, 10x nagyítás. (Patai és mtsai 2014)

#### 2.4.2.2. Szesszilis fogazott adenoma (sessile serrated adenoma, SSA)

A szesszilis fogazott adenoma (SSA) a második leggyakoribb fogazott polip, az összes fogazott polip 20%-át teszi ki (Aust és Barretton 2010), bár mérsékeltebb prevalenciáról (3-8%) is beszámoltak (Higuchi és mtsai 2005). Saját vizsgálataink alapján magyarországi előfordulásuk ennél lényegesen alacsonyabb. Bár az SSA elsősorban jobb oldali vastagbélfélben fordul elő, de újabb megfigyelések szerint számuk a bal oldalon is jelentős (Hazewinkel és mtsai 2014). Kockázati tényezők között a dohányzás, az 50 év feletti kor, és az acetilszalicilsav szedés hiánya szerepel (Bouwens és mtsai 2013). Mint már említettük 2003 előtt a fogazott adenomákat hiperplasztikus polipok közé sorolták be. Egy közelmúltban

	Szesszilis fogazott	Tradicionális	Hiperplasztikus	
	adenoma (SSA)	fogazott adenoma	polipok	
		(TSA)	( <b>HP</b> )	
Elhelyezkedés	jobb oldal	bal oldal	bal oldal	
Makroszkópos	sessilis, lapos,	nyeles	lapos	
jellemzők	nyálkával fedett,			
	homályos határ			
Szín	normokróm, fakó	vöröses	fakó	
Méret	>5 mm	>5 mm	<5 mm	
Molekuláris jellemzők	BRAF mutáció	KRAS mutáció	vegyes	
Szövettani jellemzők	tágult, elágazó	megnyúlt fogazott	fogazottság a	
	(fordított T és L	crypták, eosinophil	felső harmadban	
	alakú) fogazott	cytoplasma, filiformis		
	crypták a mucosa	jellegű magok		
	alsó harmadában			
Pit pattern	nyitott típus (II-O	páfrány vagy	csillag alakú	
	típus)	tobozalakú	(II. típus)	
Feltételezett megelőző	MVHP	GCHP	ACF	
állapot				
Malignus elfajulás	+++	++	-	
valószínűsége				
DNS-metiláció foka	magas (CIMP-H)	alacsony (CIMP-L)		
MSI-státusz	MSI-H vagy MSS	MSI-L vagy MSS	MSS	
Nemi előfordulás	női dominancia	férfi dominancia	férfi dominancia	
Diszplázia	-	+	-	
Ektópiás kripta	-	+	-	

2. táblázat. A fogazott polipok legfontosabb jellemzői (Patai és mtsai 2014)

ACF: aberráns kripta fókusz, BRAF: B-raf onkogén, CIMP-H: CpG-sziget metilátor fenotípus nagyfokú metilációval, CIMP-L: CpG-sziget metilátor fenotípus kisfokú metilációval, GCHP: kehelysejtben gazdag hiperplasztikus polip, KRAS: Kirsten ras viral onkogén, MSI-H: nagyfokú mikroszatellita-instabil, MSI-L: kisfokú mikroszatellita-instabil, MSS: mikroszatellita-instabil, MVHP: mikrovezikuláris hiperplasztikus polip

közölt esettanulmányban hiperplasztikus polipokat az új WHO osztályozás alapján retrospektív szövettanilag újravizsgáltak, és jelentős részüket (különösen a proximális, 5 mmnél nagyobbakat) SSA kategóriába sorolták át (Fidalgo és mtsai 2014). Ezek alapján látható, hogy a HP és az SSA makroszkópos és mikroszkópos elkülönítése nehéz feladat. A 3 altípus közötti főbb hasonlóságokat és különbségeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

Az SSA-ra szövettanilag a legjellemzőbb eltérés a lamina muscularis felé táguló, azon fordított T-, L-, V-alakban szétterülő, bázisaikon is érett kehelysejteket tartalmazó kripták jelenléte (6. ábra). Néha a lamina muscularis alatt invertált kripták (pszeudoinvázió) jelenhetnek meg (Aust és Barretton 2010).



6. ábra. SSA szövettani jellemzői. A lamina muscularis felé táguló, azon fordított T-, L-, V-alakban szétterülő, basisaikon is érett kehelysejteket tartalmazó kripták (felső kép, hematoxilin-eozin festés, 40x nagyítás). A proliferációs zóna kiszélesedik (alsó kép, ki-67 immunhisztokémiai festés, 40x nagyítás). (Patai és mtsai 2014)

Endoszkóposan az SSA lapos, néha a nyálkahártyából kissé kiemelkedő, általában 5 mm-nél nagyobb, szabálytalan szélű, normochrom lézió, amelyet az esetek több mint felében sárgás nyálkasapka fed ("tojásleves jel") (Huang és mtsai 2011, Tadepalli és mtsai 2011). A felszíne sima vagy granuláris, néha egy vaskosabb nyálkahártyaredőt utánozhat, gyakran redők mögött helyezkedik el (Huang és mtsai 2011). Mindezek miatt hagyományos, fehérfényű

endoszkópiával (7. ábra) felismerésük nehéz, ezért a modernebb endoszkópos eljárások (kromoendoszkópia, virtuális kromoendoszkópia (NBI, FICE, i-SCAN), autofluoreszcencia stb.) szerepét is intenzíven vizsgálják ebben a témakörben (Bouwens és mtsai 2014). Nagyító endoszkópiával egy új "pit pattern"-t (II-O típus) azonosítottak, amely segítségével 97%-os specificitás mellett, 65%-os szenzitivitással sikerült az SSA-t felismerni, azt a hiperplasztikus polipoktól (II típus) elkülöníteni (Kimura és mtsai 2012).



7. ábra. SSA jellegzetes endoszkópos képe. A nyálkahártyából alig kiemelkedő, lapos, 5 mm-nél nagyobb, normochrom lézió. Jellemző még a nyálkasapka ("mucus cap", "tojásleves jel") jelenléte is, amely azonban ez erélyes előkészítés következményeként lesodródhat. (Patai és mtsai 2014)

Az SSA bizonyos gének DNS-metilációjának hatására diszplázián keresztül egy speciális fenotípusú (CIMP-H, nagyfokú metilációval rendelkező) vastagbéldaganattá progrediálhat (8. ábra) (Patai és mtsai 2013). Feltételezik, hogy a progresszió gyorsabb, mint a hagyományos az adenoma-karcinoma szekvencia során (Sheridan és mtsai 2006), ezt részben a molekuláris részben megfigyelésekkel háttérrel, klinikai magyarázzák. Egy sokat idézett esettanulmányban egy el nem távolított SSA-ból 8 hónap múlva korai, invazív rák alakult ki (Oono és mtsai 2009). Részben a fentiek összességével is magyarázható, hogy a negatív vastagbéltükrözések után felfedezett, úgynevezett intervallumrákok között ezen molekuláris altípus előfordulása a leggyakoribb (Arain és mtsai 2010).



8. ábra. A fogazott útvonal molekuláris eseményei. ACF: aberráns kripta fókusz, BRAF: B-raf onkogén, CIMP-H: CpG-sziget metilátor fenotípus nagyfokú metilációval, CIMP-L: CpG-sziget metilátor fenotípus kisfokú metilációval, GCHP: kehelysejtben gazdag hiperplasztikus polip, IGFBP7: Insulin-like growth factor-binding protein 7, KRAS: Kirsten ras viral onkogén, MAPK: mitogen-activated protein kinases (jelátviteli útvonal), MGMT: O-6-metilguanin-DNS metiltranszferáz, MLH1: MutL homolog 1 (hibajavító gén és fehérje), MSI-H: nagyfokú mikroszatellita-instabil, MSI-L: kisfokú mikroszatellita-instabil, MSS: mikroszatellita-stabil, MVHP: mikrovezikuláris hiperplasztikus polip. (Patai és mtsai 2013 alapján)

#### 2.4.2.3. Tradicionális fogazott adenoma (traditional serrated adenoma, TSA)

A TSA a legritkább fogazott polip, a polipok kevesebb, mint 1%-a (Hazewinkel és mtsai 2013). Elsősorban a bal oldali, distalis vastagbélben fordul elő, makroszkóposan a hagyományos adenomákra emlékeztet, gyakran nyeles, polipoid. Mindig tartalmaz citológiai diszpláziát (90%-ban low-grade és 10%-ban high-grade) (Aust és Barretton 2010), szintén vastagbéldaganattá alakulhat, bár ez az útvonal kevésbé ismert (Patai és mtsai 2013) (8. ábra). Szövettanilag a megnyúlt kripták fogazottá válnak, azokban eozinofíl citoplazma mellett, a sejt középen elhelyezkedő filiformis jellegű magok jelennek meg, amelyek néhol pszeudostratifikációt is mutatnak (9. ábra). A komplex, fogazott struktúra az ektópiás

kriptákból alakul ki. Ez az ektópiás kripta képződés (ectopic crypt formation, ECF) patognómikus szövettani jel (Torlakovic és mtsai 2008).



9. ábra. TSA jellegzetes szövettani képe. A megnyúlt fogazott kriptákban eozinofil citoplazma mellett, a sejt középen elhelyezkedő filiformis jellegű magok jelennek meg, amelyek néhol pszeudostratifikációt is mutatnak. A komplex, fogazott struktúra az ectopiás cryptákból alakul ki, ez az ektópiás kripta képződés (ectopic crypt formation, ECF) a TSA patognómikus szövettani jele. Hematoxilin-eozin festés, 40x nagyítás. (Patai és mtsai 2014)

## 2.5. Háttérjelenség (field effect, field cancerization): DNS-metiláció jelenléte a tumor melletti egészséges nyálkahártyában

Bizonyos daganatkeltő ágensek (például krónikus gyulladás, dohányzás) hatására a makroszkóposan és szövettanilag épnek tűnő nyálkahártyában (epi)genetikai elváltozások alakulhatnak ki, amelyek daganatképződésre érzékeny területeket hozhatnak létre akár az egész nyálkahártyában (Ushijima és mtsai 2007). Ezek a területek ismételt behatásokra malignizálódhatnak. Ezt a jelenséget *field effect*-nek vagy *field cancerization*-nek nevezik (Slaughter és mtsai 1953), amelyet háttérjelenségnek fordítottam. Ez a magyarázata annak a klinikai megfigyelésnek is, hogy sebészi eltávolítás ellenére a kiváltó karcinogén ágens (dohányzás, alkohol) hatására a szájüregi rákok a nyálkahártya egy másik részén recidiválhatnak (Slaughter és mtsai 1953).

#### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során a vastagbéldaganat kialakulásának egyes állomásainak DNS-metilációs változásait vizsgálatam meg, valamint azt hogy ez hogyan hat a gén- és fehérjeexpresszióra. Célkitűzéseimet az alábbi főbb pontokban foglaltam össze:

- 96 gén DNS metilációs státuszának, valamint 12 gén gyakori mutációjának vizsgálata
  - o egészséges vastagbélmintákon,
  - o rákmegelőző állapotokban (hagyományos és fogazott adenomák),
  - o gyulladásos bélbetegségekben,
  - o CRC-s,
  - valamint CRC melletti szövettanilag ép mintákon
- A promóter DNS-metiláció hatásának vizsgálata a gén mRNS- és fehérjeexpresszió szintjére
- A tumor mikrokörnyezeti DNS-metilációs eltérések vizsgálata a WNT-jelátviteli útvonal szabályozásában
- Demetilációs kezelésre adott mRNS-expressziós változás mértékének meghatározása a vizsgált génekre vonatkozóan vastagbél adenokarcinóma sejtvonalban

#### 4. MÓDSZEREK

#### 4.1. Betegek és mintagyűjtés

A DNS-metilációs vizsgálatokhoz a klinikai mintákat a rutin kolonoszkópia során, a szövettani vizsgálatra történő biopsziás mintavétellel párhuzamosan nyertük, majd RNALater Stabilization Solutionbe tettük (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), azt követpen felhasználásig –80°C-on tároltuk. A gyűjtött bioptátumok csoportjait, mintaszámát, valamint a dolgozat további részében használt rövidítéseit a 3. táblázatban, az egyes minták demográfiai jellemzőit a Függelék 2. és 3. táblázatában foglaltam össze.

Mintacsoport	Rövidítés	Mintaszám
Gyermek ép (young)	Y	5
Felnőtt ép (normal healthy adult)	Ν	5
Colitis ulcerosa, aktív stádium	UCa	4
Colitis ulcerosa inaktív stádium	UCi	4
CRC-től <2 cm-re (field)	F	4
CRC-től >10 cm-re (cancer normal)	CN	4
Tubularis adenoma low-grade diszplaziával	LGD	17
Adenoma high-grade diszplaziával	HGD	6
Szesszilis fogazott adenoma	SSA	4
Tradicionális fogazott adenoma	TSA	1
Vastag- és végbélrák, I-III. stádium	CRC	17
Vastag- és végbélrák, IV. stádium	MCRC	7

3. táblázat: A DNS-metilációs vizsgálatok mintacsoportjai

A gyermekek (0-18 év) kolonoszkópiájának indikációjaként hasi fájdalom szerepelt. Az endoszkóposan épnek véleményezett vastag- és végbélmintákat a szövettani vizsgálat igazolta. A háttérjelenség (field effect) vizsgálatára a később szövettanilag igazolt CRC makroszkópos szélétől 4 beteg esetében kevesebb mint 2 cm-re, valamint legalább 10 cm-re 1-1 biopsziás mintát vettünk (10. ábra). A két colitis ulcerosás mintacsoport egyikébe a klinikailag és szövettanilag aktív betegekből származó minták kerültek, a másik

mintacsoportban a legalább öt éve colitis ulcerosa miatt kezelt, klinikailag és szövettanilag is inaktív betegek bioptátumait dolgoztuk fel.



10. ábra. A háttérjelenség (field effect) vizsgálatára vett biopsziás minták helyzete

#### 4.2. Etikai engedélyek

A vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően a helyi és az országos etikai engedélyek (TUKEB engedélyszámok: 69/2008, 202/2009, 23970/2011) birtokában végeztem. A kolonoszkópiára, a biopsziás mintavételekre és a DNS-metilációs vizsgálatokra a betegek szóbeli és írásbeli tájékoztatása, és beleegyező nyilatkozat aláírása után került sor. A 18 év alatti páciensek esetén az egyik szülő írta alá a belegyező nyilatkozatot.

#### 4.3. DNS-metiláció szenzitív restrikciós enzim array vizsgálat (Methyl Profiler)

A DNS kivonásához a biopsziás mintákat 2%-os nátrium-dodecilszulfátban (SDS) homogenizáltam és 16 órán keresztül 56°C-on 4 mg/mL proteináz K-val emésztettem. A DNS-izoláláshoz High Pure PCR Template Preparation Kitet (Roche, Penzberg, Germany) használtam a gyártó előírásai szerint. A DNS-t 2x100 µl RNáz- és DNáz-mentes desztillált vízbe eluáltam és felhasználásig -20°C-on tároltam.

A DNS-metilációs profilok vizsgálatára az EpiTect Methyl qPCR Array System-et (Qiagen, Hilden, Germany) használtam. Ebben a módszerben a DNS-metiláció kimutatása restrikciós enzimes emésztést követően történik. Egy ún. metiláció-szenzitív restrikciós enzim a nem metilált DNS-t, míg a metiláció-dependens restrikciós enzim a metilált DNS-t bontja. E módszer segítségével egy 384 lyukú lemezen egy mintából párhuzamosan 96 gén (4. táblázat) metilációját vizsgáltam. Egy génhez 4 lyuk tartozott; az egyik lyukban a metiláció-szenzitív, a másikban a metiláció-dependens, a harmadikban mindkét enzim, a negyedikben egyik enzim sem volt jelen (11. ábra).

 táblázat. A DNS-metiláció szenzitív restrikciós enzim array-vel (Methyl Profiler) vizsgált 96 gén listája

Gén	Gén teljes neve
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
ALX4	ALX homeobox 4
APBA1	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1
APBA2	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2
APC	Adenomatous polyposis coli
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
B4GALNT2	Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2
BAGE	B melanoma antigen
BMP3	Bone morphogenetic protein 3
BNC1	Basonuclin 1
CALCA	Calcitonin-related polypeptide alpha
CAVI	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
CCNA1	Cyclin A1
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CDX1	Caudal type homeobox 1
CDX2	Caudal type homeobox 2
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
CNR1	Cannabinoid receptor 1 (brain)
CRABP1	Cellular retinoic acid binding protein 1
CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A)
	small phosphatase-like
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
DAB2IP DAB2 interacting protein	
DACT2	Dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 2 (Xenopus laevis)

DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
DKK2	Dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)
DKK3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
EPHB2	EPH receptor B2
EPHB4	EPH receptor B4
EXTL3	Exostoses (multiple)-like 3
EYA2	Eyes absent homolog 2 (Drosophila)
FAM84A	Family with sequence similarity 84, member A
GALR2	Galanin receptor 2
H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
HLTF	Helicase-like transcription factor
HNF1B	HNF1 homeobox B
HS3ST2	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2
hsa-mir-	microRNA 342
342	
ID4	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7
LRRC3B	Leucine rich repeat containing 3B
MAGEA1	Melanoma antigen family A, 1
MAL	Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein
МСС	Mutated in colorectal cancers
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1	MutL homolog 1 (E. coli)
MSX1	Homeobox, msh-like 1
NEUROG1	Neurogenin 1
NID1	Nidogen 1
NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
OPCML	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
PAX2	Paired box gene 2
PCDH10	Protocadherin 10

PDLIM4	PDZ and LIM domain 4
(RIL)	
PGF	Placental growth factor
PRDM5	PR domain containing 5
PROM1	Prominin 1
PTGIS	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and
cyclooxygenase)	
RAB32	RAB32, member RAS oncogene family
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RBP1	Retinol binding protein 1, cellular
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SCNN1B	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
SFRP5	Secreted frizzled-related sequence protein 5
SLC16A12	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 12
SLC5A8	Solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8
SLIT2	Slit homolog 2 (Drosophila)
SLIT3	Slit homolog 3 (Drosophila)
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
SST	Somatostatin
STK11	Serine/threonine kinase 11
TAC1	Tachykinin 1
TFAP2C	Transcription factor AP-2, gamma
TMEFF2	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2
UCHL1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
UGTIAI	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
VIM	Vimentin

WIF1	Wnt inhibitory factor 1
WNT5A	Wingless-related MMTV integration site 5A
WRN	Werner syndrome homolog (human)
WT1	Wilms tumor 1 homolog
ZNF442	Zinc finger protein 442

A hipermetilált, a közepesen metilált és a nem metilált DNS részarányát az enzimatikus emésztés nélküli reakcióhoz hasonlítottam. A DNS metiláltságát pozitívnak tekintettem, ha a hipermetilált frakció metiláltságának a 15%-át meghaladta, negatívnak tartottam, ha a metiláltság e küszöbértéket nem érte el.

Az izolált DNS-ből 2 µg-ot négy egyenlő részre osztottam, és a fentiekben részletezett módon négy reakcióelegyet hoztam létre, majd 16 órán keresztül 37°C-on inkubáltam (enzimaktiváció), végül 65°C-ra melegítve a reakciót, inaktiváltam. Majd folyadékkezelő epMotion 5070 pipettázó automata használatával (Eppendorf, Hamburg, Németország) a négy reakcióelegyet a lemez 384 lyukába egyenlően elosztottam. Ezt követően real time qPCR reakciót végeztem LightCycler 480 (Roche) gép segítségével. A PCR paraméterei az alábbiak voltak: 95°C-on 10 percig, 40 ciklus 97°C-on 15 másodpercig, 72°C-on 1 percig. A PCRreakciót követően a kívánt termék ellenőrzésére nagyfelbontású olvadáspont- (high resolution melting, HRM) elemzést végeztem (65°–95°C-ig 1 másodperc szünet 0.04°C-ként). Ezt követően a C<sub>T</sub> értékeket exportáltam és  $2^{-\Delta\Delta CT}$  elemzést végeztem. A C<sub>T</sub> érték és a reakció előtti DNS mennyisége fordítottan arányos, valamint a PCR-termék reakció exponenciális fázisában ciklusonként megduplázódik.



11. ábra. A DNS-metiláció szenzitív restrikciós enzim array vizsgálat (Methyl Profiler) működése. Részletes magyarázat a szövegben található (Patai és mtsai 2017 után módosítva, a Qiagen és Dr. Shankar Sellappan, PhD engedélyével)

#### 4.4. DNS-metiláció specifikus (biszulfit) PCR-vizsgálat, olvadáspont elemzés

Az izolált genomiális DNS-mintákat EZ-DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) segítségével biszulfit-konvertáltuk. A gyártó javaslatának megfelelően a hatékony konverzió eléréséhez a DNS mennyiségét reakcióként 500 ng-ban maximáltuk. A kinyert biszulfit-konvertált DNS koncentrációját Qubit 2.0 fluorométerrel (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) kvantifikáltuk.

A PCR és szekvenáló primereket PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) és BiSearch (bisearch.enzim.hu/, Enzimológiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, Magyarország) szoftver segítségével terveztük a releváns CpG szigetek régiójába (Arányi és Tusnády 2007). А CpG szigeteket UCSC Genome Browser adatbázis (https://genome.ucsc.edu/) CpG Plot (EMBOSS) szoftver segítségével terveztük. A PCR amplifikációt és a nagyfelbontású olvadáspont (high-resolution melting curve, HRM) elemzést a LightCycler 480-n végeztük. A 15 µl-es reakciótérfogat AmpliTaq Gold PCR Master Mixet (Applied Biosystems, Life Technologies), 0,25 µl ResoLight Dye-t (Roche), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 0,13 µM primert (Invitrogen) és 3 ng biszulfit-konvertált DNS-templátot tartalmazott. Az amplifikáció paraméterei a következők voltak: denaturálás 10 percig 95°Con, amelyet 9 ciklus 65°C-ról 55°C-ra történő fokozatosan csökkenő fokon történő annelálási hőmérséklet (ún. "touchdown") követett, majd 40 ciklus (95°C-on 30 másodpercig, 55°C-on 30 másodpercig, 72°C-on 30 másodpercig) amplifikáció. Minden reakció duplikátumokban készült. A primerszekvenciák a következőek voltak (5. táblázat).

MAL	cél: hg38 genomon chr2:95026139–95026340, amely a transzkripciós kezdettől downstream található 456–657 bp-nak felel meg
MAL-f	GGAAAAATTGGGTTTTTAATTGGGGTTAG
MAL-r	TTCAACTCCCTCTCATCTCCAAATCTC
SFRP1	cél: chr8:41309468–41309682 a hg38 genomon, amely a transzkripciós kezdet körüli 2– -213 bp-nak felel meg
SFRP1-f	ATTTAGGAGGTTGTAGGGTTGGA
SFRP1-r	TTCCCCTTCTTTTTCTCCCCTTATC
SFRP2	cél: hg38 genomon chr4:153788387–153788549, amely a transzkripciós kezdettől downstream található 524–686 bp-nak felel meg
SFRP2-f	GTTGTTAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
SFRP2-r	ATACCACCCCAACACCAAAAAATTCCTAT

5. táblázat. Metiláció-specifikus (biszulfit) PCR-primerek

Az olvadáspont-elemzést 50°C-ról 95°C-ra való felmelegítéssel végeztük, 0,03°C/másodperc felmelegítési sebességgel, 20 mérési ponttal 1°C-onként. Referenciaként az EpiTect Control DNA Kit (Qiagen) nem metilált (0%) és 100%-ban metilált DNS standard mintáit használtuk.

#### 4.5. RNS-izolálás és teljes genom mRNS-expresszió microarray vizsgálat

Teljes RNS-t az RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontunk ki. A teljes genom mRNS-expresszió microarray vizsgálatot munkacsoportunk az alábbiak szerint végezte el. Biotinilált, fragmentált cRNS próbákat szintetizáltunk a One-Cycle Target Labeling and Control Kit segítségével a gyártó (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) leírása alapján, majd 2 ciklusos T7 alapú lineáris amplifikációt végeztünk. A fragmentált cRNS próbákból 10 mg mennyiséget hibridizáltunk a HGU133 Plus2.0 array-re (Affymetrix) 45°Con 16 órán keresztül. A microarray-eket Fluidics Station 450 segítségével megfestettük és antitest-amplifikációt végeztünk. A fluoreszcens jeleket GeneChip Scanner 3000-rel detektáltuk. (Affymetrix) Az adatok Gene Expression Omnibus (GEO, a http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) nyilvános online adatbázison elérhetőek: GSE4183, GSE10714, GSE15960 és GSE37364.

# 4.6. Mismatch repair (MMR) fehérjék (MSI státusz) és SFRP1 immunhisztokémiai vizsgálata

A DNS-metilációs vizsgálatokban használt esetek formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetblokkjaikból 2 mm átmérőjű core-okból szöveti microarray-ket (TMA) készítettem a TMA Grand master készülék használatával (3DHISTECH). A TMA blokkokból 6 μm-es metszeteket készítettem, majd Superfrost Plus tárgylemezekre helyeztük, majd (VWRI, Leicestershire, UK) fixálás után egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk.

Deparaffinálást és rehidrálást követően, az endogén peroxidáz aktivitást 30 percig tartó 2,5%os, metanolban oldott hidrogén-peroxid kezeléssel szüntettük meg. Az antigénfeltárási lépést 40 percig tartó TRIS-EDTA (pH=9) pufferrel végeztük elektromos kuktában. Az aspecifikus kötődések blokkolásának érdekében a metszeteket marha szérum albuminnal (1% BSA) inkubáltuk, majd az alábbi monoklonális antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk 58°C-on: MLH1 (1:80, Santa Cruz, CA, USA), MSH2 (1:80, Santa Cruz, CA, USA), MSH6 (1:80, Santa Cruz, CA, USA), PMS2 (1:150, Santa Cruz, CA, USA), SFRP1 (1:150, Abcam, Cambridge, UK). Az antitestdetektálást a HISTOLS-MR-T kit (Hisztopatológia Kft., Pécs, Magyarország) segítségével végeztük, és 3,3'-diaminobenzidin Liquid and Substrate Chromogen System (Dako Cymation, Glostrup, Dánia) felhasználásával tettük láthatóvá. A metszeteket hematoxilin-eozin festékkel festettük meg, xilollal dehidráltuk, majd lefedtük.

Digitális archiválást (Pannoramic Flash 250, 3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) követően a digitalizált szövettani mintákat Pannoramic Viewer szoftver segítségével (v:1.15; 3DHISTECH) értékeltük ki.

A mintát MSS-nek tekintettük, ha mind a 4 MMR fehérje (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) megtartott festődést mutatott az egészséges vastagbélnyálkahártyához képest. A fehérjeexpressziót az alábbiak szerint értékeltük ki: 0 (nincs immunreakció), +1 (gyenge), +2 (közepes), and +3 (erős, diffúz citoplazmatikus festődés).

## 4.7. A miofibroblasztok SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1)-termelésének vizsgálata

A stromális miofibroblasztok vizsgálatához  $\alpha$ -SMA-SFRP1 kettős fluoreszcens festést használtunk normális (n=20), CRC (n=35) valamint olyan CRC mintákban, amelyek NAT területet is tartalmaztak (n=12). A metszeteket  $\alpha$ -SMA (Dako, CA, USA) Alexa Fluor 488 fluorokrómmal jelölt (Invitrogen, Eugene, CA, USA) és SFRP1 (ab4193, Abcam, Cambridge, UK, 1:500) Alexa Fluor 546 fluorokrómmal jelölt, Invitrogen) ellenanyaggal inkubáltuk. A mintákat az 4.6 fejezetben ismertett módon digitálisan archiváltuk és elemeztük. A normális és a CRC területeken a digitális mikroszkóp Marker Counter modulja segítségével 1000 db  $\alpha$ -SMA-pozitív stromális sejtet számoltunk le, amíg az elváltozást mutató NAT és a CRC területek között elhelyezkedő átmeneti zónákban (ezek korlátozott mérete miatt) ez a szám 150-300 volt. Az adatok elemzéséhez egyszempontos ANOVA-t használtunk.

#### 4.8. Demetilációs kísérletek sejtkultúra modellben

Demetiláló, 5-aza-2'-deoxicitidin kezelést végeztünk HT29 vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon (ATCC szám: HTB-38). A sejteket 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>–ban és 10% FCS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) egy 25 cm<sup>2</sup>-es sejtkultúra flaskában, 1 500 000 sejt/flaska sűrűségben 24 órán keresztül inkubáltuk. A demetilációs kezelést 3 párhuzamos kísérletben 10 µM 5-aza-2'-deoxicitidinnel (Sigma-Aldrich) végeztük 72 órán keresztül FCS-mentes médiumban. A kontroll sejttenyészetekhez PCR tisztasságú víz és ecetsav (az 5-aza-2'-deoxicitidin oldószerének) 1:1 arányú keveréket

adtuk. A sejtekből RNS-t vontunk ki és teljes genom mRNS-expresszió microarray vizsgálatot végeztünk a fentiek szerint. Az adatok a Gene Expression Omnibus adatbázison a GSE29060 szám alatt érhetők el. Az általunk használt HT29 sejtvonal molekuláris fenotípusát tekintve MSS, *KRAS* vad, *BRAF* V600E mutáns (Ahmed és mtsai 2013), ezért a GEO adatbázisból további *in silico* elemzések céljából egy másik munkacsoport által elvégzett, eltérő molekuláris fenotípusú (MSI, KRAS mutáns, BRAF vad) vastagbélrák sejtvonal, a HCT116 5-aza-2'-deoxicitidin/trichostatin A kezelés teljes genom mRNS-expressziós eredményeit (GSE14526) is megvizsgáltuk (Yagi és mtsai 2010).

#### 4.9. BRAF és KRAS mutációk vizsgálata

Minden mintán elvégeztük a *BRAF* V600E és *KRAS* 12-es és 13-as kodon mutációjának vizsgálatát.

A *BRAF* V600E mutációt Richman és mtsai munkája (Richman és mtsai 2009) alapján végeztünk az alábbi módosításokkal. A vizsgálatához 20 ng genomiális DNS-t és 12,5 μL HotStarTaq Master Mix-et (Qiagen) 25 μL végtérfogatban kevertünk össze. A primerek a 6. táblázatban találhatóak. A PCR-reakció körülményei a következők voltak: denaturálás 95°C-on 12 percig, majd 40 ciklus (95°C-on 10 másodpercig, 55°C-on 20 másodpercig, 72°C-on 20 másodpercig).

#### 6. táblázat. BRAF primerek szekvenciája

BRAF_fw_BIO	TCCAGACAACTGTTCAAACTGAT
BRAF_rev	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
BRAF_seq	TGATTTTGGTCTAGCTACA

A PCR-termékek szekvenálása PyroMark Q24 piroszekvenátorral (Qiagen), a BRAF mutáció státusz elemzése PyroMark Q24 szoftverrel (Qiagen) történt.

A *KRAS* 12-es és 13-as kodon mutációjának vizsgálatára mutagén PCR-rel kombinált restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) módszert használtunk. Hatzaki és mtsai munkája alapján (Hatzaki és mtsai 2001) az alábbi módosításokkal: 10 ng genomiális DNS-hez 20 μl végtérfogatban 0,5 μM primert, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>-t és ImmoMix Red-et (Bioline, London, UK) adtunk. Az amplifikációt Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies) készülékkel az alábbi

protokoll szerint végeztük: 10 perc 95°C-on, 10 ciklus 95°C-on 40 másodpercig, 58°C-on 40 másodpercig, és 72°C-on 40 másodpercig, majd 30 ciklus 86,5°C 40 másodpercig, 58°C 40 másodpercig, valamint 72°C 40 másodpercig, és végül 72°C 10 percig. A használt primerek szekvenciái a 7. táblázatban láthatók.

#### 7. táblázat. KRAS primerek

KRAS 12-es kodon	
Mc12-f	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT
Mc12-r	CTGTATCAAAGAATGGTCCTGGACCAGTA
KRAS 13-es kodon	
Mc13-f	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCTGGT
Mc13-r	AGAAGCCTTTATGGCTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA

A PCR-termékeket BstNI vagy BglI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) restrikciós endonukleázzal emésztettük, majd az Experion Automated Electrophoresis állomáson (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) elemeztük. Attól függően, hogy a vizsgált allél vad típusú vagy mutáns volt-e, a 12-es kodon vizsgálatánál a 162 bp hosszú PCR-termék hasítása 113 vagy 142 bp hosszú fragmentet, míg 13-as kodonnál a 174 bp hosszú termék hasításakor 165 vagy 125 bp hosszú fragmentet kaptunk.

#### 4.10. Mutációs eltérések vizsgálata új generációs szekvenálással

A mutációk gyakoriságának átfogóbb jellemzésére, a fenti napi rutinban használt mutációkon kívül még 10, tehát összesen 12 CRC-ben gyakran előforduló gén (*APC, BRAF, CTNNB1, EGFR, FBXW7, KRAS, MSH6, NRAS, PIK3CA, SMAD2, SMAD4, TP53*) mutációjának vizsgálatára saját PCR-primereket terveztünk (Péterfia és mtsai 2017). Ebben a vizsgálatban CRC mellett elhelyezkedő szövettanilag ép (NAT, n=8), low-grade diszpláziát (AD-LGD, n=17), high-grade diszpláziát tartalmazó adenoma (AD-HGD, n=6), fogazott adenoma (AD-serr, n=11 – korábbi mintáinkat 6 új mintával egészítettük ki), valamint CRC mintákat (n=17) vizsgáltunk új generációs szekvenálással. Az amplikonokat GS Junior eszközzel (Roche) szekvenáltuk meg. A PCR-termékekhez Rapid Library Molecular Identifier (RL\_MID) adaptorokat ligáltunk. Az így készült PCR könyvtárak minőségét High Sensitivity DNS chippel vizsgáltuk az Agilent 2100 Bioanalyzer mikrokapilláris elektroforézis készüléken

(Agilent, Santa Clara, CA, USA). Az amplikon könyvtárak emulziós PCR-amplifikációját Lib-L emPCR Kittel (Roche) végeztük, a gyártó ajánlása alapján 2 DNS-molekula – 1 gyöngy arányban. A gyöngyök dúsításához és a szekvenáláshoz a GS Junior Titanium Sequencing Kitet (Roche) használtunk. A variánsokat az Amplicon Variant Analyzer szoftverrel elemeztük.

#### 4.11. Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag±standard deviációban (SD) adtuk meg. Az adatok összehasonlítására Student féle t-próbát és ANOVA-t használtunk. Szignifikáns eltérésnek a p<0,05-t fogadtuk el. Minden statisztikai elemzést az R program környezetben végeztünk el (R core team 2012).

#### 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Jó- és rosszindulatú vastagbéldaganatok metilációs mintázatának összehasonlítása

A vizsgált csoportok metilációs mintázatának összehasonlításakor a jóindulatú, rákmegelőző állapotokban (LGD, HGD), valamint CRC-ben lényegesen több metilált gént találtunk, mint az egészséges gyermek és felnőtt mintákban (8. táblázat). Gyulladásos bélbetegségben, sem a szövettanilag aktív, sem az inaktív colitis ulcerosás mintákban nem találtunk lényeges különbséget a vizsgált gének metilációs státuszában az egészséges mintákhoz képest (8. táblázat). Low és high-grade adenomákban valamint CRC-ben azonban azonosítottunk egy jellegzetes metilációs mintázatot: 10 gént sikerült azonosítani, amelyek a jó- és rosszindulatú vastagbél daganatok több mint 85%-ában metilált volt (9. táblázat), ugyanakkor az egészséges gyermek és felnőtt, daganat melletti szövettanilag ép, valamint gyulladásos mintákban nem (vagy csak 1-1 esetben) voltak metiláltak (akkor is a 15%-os metilációs küszöbérték határán) (10. táblázat). Érdekes módon, ezek a gének metasztatikus CRC-ben (MCRC) nem voltak metiláltak. Az adott gének metiláltsági fokának átlaga a diszplasztikus (HGD majd LGD) mintákban volt a legmagasabb, ezt követték a CRC-s minták, míg a legalacsonyabb értékeket a MCRC-ben láttuk (9. táblázat).
### 8. táblázat. Metilált gének átlag metilációs százaléka az egyes csoportokban

- A. A minták >95%-ában metilált gének
- B. Minden daganatos mintában (beleértve az MCRC-t) metilált gének
- C. Low-grade diszpláziában (LGD-ben), high-grade diszpláziában (HGD), valamint I-III stádiumú vastagbélrákban metilált gének
- D. Csak egyes csoportokban metilált gének
- Félkövéren szedett: olyan gének, amelyek az adott csoport mintáinak legalább felében metiláltak voltak.

CN: vastagbélráktól >10 cm-re vett szövetminta CRC: I-III stádiumú vastag- és végbélrák F: vastagbélráktól <2 cm-re vett szövetminta HGD: high-grade diszpláziát tartalmazó adenoma LGD: low-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

- EOD. 1017 Grude diseptuellar artannaeo adenoma
- MCRC: távoli áttétet adó, IV. stádiumú vastag- és végbélrák
- N: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél idősebb felnőttből
- SD: standard deviáció
- UCa: szövettanilag aktív colitis ulcerosás szövetminta
- UCi: szövettanilag inaktív colitis ulcerosás szövetminta
- Y: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél fiatalabb gyerekből

Α.	Y	Ν	CN (10 cm)	F (1 cm)	LGD	HGD	CRC	MCRC	UCi	UCa
BAGE	97,39±1,32	76±15,83	79,72±11,97	66,2±21,11	95,43±3,35	93,46±8,09	82,52±18,2	90±11,83	76,65±5,61	78,4±7,83
CCNA1	2,75±1,48	30,76±23,14	24,74±10,49	18,17±10,12	67,1±23,44	61,99±17,72	43,94±9,66	33,46±9,6	23,7±20,65	8,96±4,12
H19	47,91±2,89	46,33±5,82	37,36±7,5	37,17±11,42	33,95±13,46	38,72±15,54	44,16±17,53	42,35±4,89	40,96±12,74	46,39±6,27
MAGEA1	98,18±1,14	73,73±13,92	86,44±9,69	90,08±4,23	79,14±33,83	61,85±44,1	76,63±25- 96	90,23±13,21	63,94±15,08	80,93±7,84
MSX1	13,9±3,3	17,26±3,96	20,2±10,87	15,66±5,46	66,64±24,29	57,98±14,36	46,63±17,95	29,4±7,3	34,95±17,57	20,57±4,08
PTGIS	22,95±13,09	43,84±10,57	49,64±4,72	43,29±10,54	79,98±17,71	79,14±17,34	59,71±15,84	56,29±18,53	44,67±20,47	39,43±11,62
RUNX3	34,95±11,62	42,96±12,45	38,94±7,53	37,9±10,99	71,33±21,56	69,82±12,09	58,52±13,82	52,39±9,39	41,59±13,79	56,96±5,15
SPARC	21,42±8,49	42,08±10,87	42,86±6,75	38,97±11,28	65,02±19,86	49,02±33,01	46,86±15,24	45,43±6,01	31,75±17,67	31,34±15,04
UGT1A1	84,15±6,49	51,13±3,28	86,53±8,32	85,75±5,88	91,49±9,46	89,29±10,02	94,9±4,69	81,26±22,83	47,49±3,42	58,42±3,94
В.										
BNC1	2,02±1,0	16,37±17,49	11,67±8,14	8,71±5,11	63,95±24,45	53,8±17,43	31,99±14,53	20,15±3,63	12,84±10,01	7,83±3,86
SST	3,56±1,96	12,07±10,84	11,99±5,51	8,35±6,42	35,57±23,77	49,74±23,41	30,98±14,29	15,53±8,99	7,42±5,09	6,99±3,88
С.										
ADAMTS1	0,56±0,66	0,37±0,34	0,49±0,75	0,52±0,39	19,38±29,92	43,26±35,45	18,18±19,41	1,23±0,87	0,83±0,57	0,15±0,57
ALDH1A3	0,75±0,45	4,12±3,32	3,77±1,9	2,82±1,69	53,95±38,12	74,36±18,83	37,22±23,74	6,73±2,64	3,61±2,74	2,62±1,19
ALX4	0,72±0,59	0,69±0,57	0,8±0,84	0,72±0,2	33,94±35,79	51,47±41,78	27,76±26,83	1,26±1,04	1,34±0,98	0,94±0,42
CDH13	1,6±0,92	1,23±0,85	3,93±3,82	2,47±0,98	32,79±34,53	33,47±27,99	25,75±25,35	3,7±2,82	2,42±2,64	3,08±1,56
DKK2	4,21±0,93	8,6±4,47	5,09±3,25	4,13±0,99	39,93±25,97	46,7±17,31	31,54±18,05	7,04±2,99	11,13±13,86	9,11±4,77
DKK3	1,61±1,45	1,95±0,52	2,02±2,76	1,31±0,19	21,04±28,46	32,3±32,37	23,36±19,79	4,76±5,03	2,89±2,56	1,9±1,03
GALR2	2,24±1,02	2,2±1,65	3,71±2,38	2,18±0,51	37,63±33,64	50,16±29,88	25,88±24,27	5,79±4,12	4,6±2,73	4,33±2,42
HLTF	5,06±1,44	5,39±1,79	4,45±1,34	4,78±1,51	19,71±15,27	33,01±27,9	18,36±15,74	8,17±4,72	6,35±7,34	8,91±4,6
hsa-mir- 342	0,53±0,5	1,18±1,61	2,82±2,98	2,14±3,09	42,73±22,86	17,71±27,98	21,27±16,69	3,81±3,23	0,39±0,33	0,4±0,27
LRRC3B	1,44±0,93	3,59±3,61	1,96±1,2	1,1±0,66	26,39±12	35,55±24,78	12,68±10,04	4,94±1,81	3,1±2,77	2,14±1,34
MAL	1,03±0,49	2,65±3,28	3,71±4,06	1,75±0,83	51,79±30,94	41,39±30,32	37,14±18,83	10,21±9,15	1,38±0,99	1,49±0,63

NID1	1,26±0,83	1,43±0,64	1,52±1,52	1,13±0,23	26,86±29,06	24,35±29,84	19,33±19,46	2,28±2,12	2,55±1,6	1,78±0,92
OPCML	2,49±1,05	9,96±11,52	13,03±11,34	7,13±3,54	47,01±19,98	38,1±12,77	20,62±15,2	12,54±3,24	8,74±10,68	4,79±1,95
C.	Y	Ν	CN (10 cm)	F (1 cm)	LGD	HGD	CRC	MCRC	UCi	UCa
PCDH10	1,53±0,52	3,44±1,4	3,98±1,89	3,4±1,24	44,79±29,1	57,28±35,04	21,77±18,49	7,43±5,2	7,73±10,11	3,65±1,8
PDLIM4	2,75±0,99	12,22±11,22	7,14±3,09	7,48±4,1	40,94±39,99	77,39±20,48	28,69±21,67	12,48±7,97	13,24±8,87	7,05±3,16
RBP1	1,18±0,52	1,44±0,81	3,08±2,29	1,15±0,45	42,22±39,03	39,55±38	20,34±13,8	3,88±4,7	1,57±1,79	1,9±0,86
RPRM	2,19±0,95	2,97±1,62	4,38±1,87	2,81±0,66	25,62±28,93	26,88±33	21,41±19,23	10,25±6,48	8,4±6,9	4,76±1,26
SFRP1	0,52±0,36	4,95±4,69	4,95±4,62	3,12±2,48	60,66±25,27	54,93±30,99	31,67±16,36	7,56±2,1	8,16±12,89	3,23±2,91
SFRP2	1,79±1,26	1,55±0,99	2,33±2,39	2,27±0,64	48,49±34,63	51,63±30,57	27,49±14,35	5,26±4,52	2,51±1,82	2,5±0,72
SLC16A12	0,85±0,94	0,89±0,63	1,64±1,67	0,92±0,23	25,78±29,43	41,5±39,64	21,53±21,37	2,24±1,3	4,04±4,44	1,76±0,94
SLIT2	1,68±0,89	2,58±2	6,93±8,21	4,05±1,89	58,58±32,95	47,79±29,48	26,32±17,86	9,12±3,4	6,85±6,02	4,06±1,87
SLIT3	0,61±0,3	2,49±2,81	1,36±1,02	1,25±0,43	38,44±30,9	41,46±22,63	27,08±21,36	5,78±8,52	4,93±5,52	1,39±0,56
TAC1	2,2±1,63	6±4,42	4,73±2,38	8,9±8,73	22,51±27,98	30,17±16,38	18,84±19,05	15,36±10,11	15,39±14,47	6,13±2,19
TMEFF2	1,36±0,71	1,23±1,07	1,93±1,69	1,46±1,05	45,87±31,23	53,79±40,26	25,27±17,33	7,5±7,49	2,73±4,09	1,94±0,63
UCHL1	2,83±1,21	2,68±2,3	2,07±2,23	2,43±0,04	29,26±35	57,78±34,35	23,29±17,5	6,27±6,03	2,24±1,62	3,79±1,9
VIM	1,54±0,65	0,65±0,5	0,89±0,99	$0,84{\pm}0,88$	40,03±34,38	46,53±40,81	27,35±22,14	3,32±3,86	2±1,63	1,92±1,27
WIF1	2,63±1,62	8,14±6,78	13,75±8,8	8,59±5,34	44,27±30	49,89±40,45	30,32±21,16	19,1±16,62	16,22±20,39	4,61±3,89
D.										
DAB2IP	1,12±0,35	1,35±0,18	0,8±0,4	0,59±0,21	20,01±26,99	27,52±23,65	8,7±7,24	6,33±10,34	2,81±0,49	0,73±0,25
HS3ST2	1,35±0,6	1,36±0,12	1,16±1,02	0,81±0,03	31,13±36,33	29,69±26,42	13,45±12,23	1,88±1,55	3,28±1,01	0,78±0,16
IGFBP3	0,23±0,32	0,22±0,26	0,3±0,29	0,29±0,21	11,03±15,37	22,92±30,86	11,98±18,37	0,5±0,5	1±1,18	0,47±0,2
WT1	0,44±0,25	0,73±0,56	0,97±1,07	0,4±0,34	22,06±31,12	31,78±31,99	12,99±19,58	1,18±1,15	1,78±1,86	0,85±0,84
CALCA	8,37±1,09	8,78±2,71	8,22±4,01	13,57±11,74	8,72±4,24	30,74±27,13	18,92±14,32	12,29±5,2	14,52±9,31	18,07±3,38
МСС	4,74±1,71	2,78±1,19	2,89±1,87	2,12±0,93	11,99±14,96	34,09±28,85	17,38±15,11	6,87±6,61	3,61±2,91	5,87±3,14
BMP3	0,17±0,23	0,12±0,02	0,18±0,26	0,07±0,02	8,65±18,27	31,09±30,12	9,46±13,85	0,21±0,27	0,27±0,07	0,07±0,01
CHFR	0,46±0,09	0,41±0,23	0,3±0,16	0,35±0,08	6,83±11,39	20,56±27,57	5,4±6,1	0,25±0,53	0,42±0,74	0,28±0,18

DACT2	0,67±0,17	0,75±0,39	1,26±1,02	1,17±0,6	4,23±6,02	33,62±31,64	6,41±11,25	1,82±1,69	2,14±1,89	2,3±0,64
EYA2	2,06±0,96	0,55±0,5	1,16±1,46	1±0,27	3,6±5,86	30,98±37,86	10,84±16,92	1,4±1,37	2,24±1,47	2,07±1
D.	Y	N	CN (10 cm)	F (1 cm)	LGD	HGD	CRC	MCRC	UCi	UCa
SFRP5	2,51±1,58	2,61±1,93	1,12±1,21	0,95±0,36	15,57±27,23	15,35±10,84	9,24±10,4	2,09±1,36	2,95±0,8	3,3±1,86
SLC5A8	0,85±0,44	3,42±3,73	2,69±1,75	3,58±1,29	12,15±13,15	34,12±42,53	11,46±19,21	4,59±3,11	2,24±0,81	3,52±1,01
TFAP2C	2,43±1,06	0,99±1,19	1,1±1,37	0,63±0,42	12,47±19,71	26,11±38,62	7,27±15,74	1,78±2,38	1,9±0,9	3,16±1,47
WNT5A	0,37±0,38	0,05±0,07	0,03±0,03	0±0	0,75±2,19	21,44±31,86	0,8±2,17	0,18±0,35	0,17±0,32	0,05±0,1
WRN	1,75±0,79	1,51±0,16	3,55±1,01	3,68±1,03	2,82±1,89	19,17±16,27	5,7±7,5	2,41±1,22	3,73±1,14	1,24±0,59

9. táblázat. A 10 leggyakrabban metilálódott gén metilációs százalékai a LGD, HGD, CRC és MCRC csoportokban

CRC: I-III stádiumú vastag- és végbélrák

HGD: high-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

LGD: low-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

MCRC: távoli áttétet adó, IV. stádiumú vastag- és végbélrák

SD: standard deviáció

	Low-grade o (LGD) (I	diszplázia n=17)	High-grade ( (HGD) (	diszplázia (n=6)	CRC (n	=17)	LGD+HGD+CRC (n=40)	MCRC (n=	7)
Gén	Átlag metiláció % ± SD	Metilált esetek (%)	Átlag metiláció % ± SD	Metilált esetek (%)	Átlag metiláció % ± SD	Metilált esetek (%)	Metilált esetek (%)	Átlag metiláció % ± SD	Metilált esetek (%)
SFRP1	60,66±25,27	100	54,93±30,99	100	31,67±16,36	94	97,5	7,56±2,1	0
SST	35,57±23,77	94	49,74±23,41	100	30,98±14,29	94	95	15,53±8,99	57
BNC1	63,95±24,45	100	53,8±17,43	100	31,99±14,53	88	95	20,15±3,63	57
MAL	51,79±30,94	100	41,39±30,32	83	37,14±18,83	88	92,5	10,21±9,15	14
SLIT2	58,58±32,95	100	47,79±29,48	100	26,32±17,86	82	92,5	9,12±3,4	0
SFRP2	48,49±34,63	82	51,63±30,57	100	27,49±14,35	94	90	5,26±4,52	0
SLIT3	38,44±30,9	94	41,46±22,63	100	27,08±21,36	76	87,5	5,78±8,52	14
ALDH1A3	53,95±38,12	88	74,36±18,83	100	37,22±23,74	76	85	6,73±2,64	0
TMEFF2	45,87±31,23	94	53,79±40,26	83	25,27±17,33	76	85	7,5±7,49	14
WIF1	44,27±30	88	49,89±40,45	83	30,32±21,16	82	85	19,1±16,62	29

- 10. táblázat. A 10 leggyakrabban hipermetilálódott gén metilációs százalékai egészséges (gyermek és felnőtt), tumor melletti szövettanilag ép (a tumor makroszkópos szélétől 10 cm-re és 1 cm-re származó) és (szövettanilag aktív és inaktív) colitis ulcerosás mintákban
- CN: vastagbélráktól >10 cm-re vett szövetminta
- F: vastagbélráktól <2 cm-re vett szövetminta
- N: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél idősebb felnőttből
- SD: standard deviáció
- UCa: szövettanilag aktív colitis ulcerosás szövetminta
- UCi: szövettanilag inaktív colitis ulcerosás szövetminta
- Y: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél fiatalabb gyerekből

	Y (gyermek) (	n=5)	N (felnőtt) (n	=5)	CN (10 cm, n	=5)	F (1 cm, n=	5)	UCi (n=4)		UCa (n=4	)
Gén	Átlag metiláció % ± SD	Eset (%)										
SFRP1	0,52±0,36	0	4,95±4,69	0	4,95±4,62	0	3,12±2,48	0	8,16±12,89	25	3,23±2,91	0
SST	3,56±1,96	0	12,07±10,84	40	11,99±5,51	40	8,35±6,42	20	7,42±5,09	0	6,99±3,88	0
BNC1	2,02±1,0	0	16,37±17,49	40	11,67±8,14	20	8,71±5,11	20	12,84±10,01	25	7,83±3,86	0
MAL	1,03±0,49	0	2,65±3,28	0	3,71±4,06	0	1,75±0,83	0	1,38±0,99	0	1,49±0,63	0
SLIT2	1,68±0,89	0	2,58±2,0	0	6,93±8,21	20	4,05±1,89	0	6,85±6,02	25	4,06±1,87	0
SFRP2	1,79±1,26	0	1,55±0,99	0	2,33±2,39	0	2,27±0,64	0	2,51±1,82	0	2,5±0,72	0
SLIT3	0,61±0,3	0	2,49±2,81	0	1,36±1,02	0	1,25±0,43	0	4,93±5,52	0	1,39±0,56	0
ALDH1A3	0,75±0,45	0	4,12±3,32	0	3,77±1,9	0	2,82±1,69	0	3,61±2,74	0	2,62±1,19	0
TMEFF2	1,36±0,71	0	1,23±1,07	0	1,93±1,69	0	1,46±1,05	0	2,73±4,09	0	1,94±0,63	0
WIF1	2,63±1,62	0	8,14±6,78	20	13,75±8,8	20	8,59±5,34	0	16,22±20,39	20	4,61±3,89	0

A vizsgált minták 95%-ában 9 hipermetilált gént találtunk (8/A táblázat), amelyek az egészséges és colitis ulcerosás mintákban egyaránt metiláltak voltak. Ezen felül további 34, 46, valamint 32 metilált gént azonosítottunk az LGD-s, a HGD-s és a CRC-s minták legalább felében (8/C táblázat). Az MCRC-s mintákban azonban csak 2 további metilált gént (8/B táblázat) figyeltünk meg. A legtöbb metilált gént tartalmazó mintacsoportban, HGD-ben 12 olyan gén volt, amely csak ebben a csoportban volt metilált (8/D táblázat). A jóindulatú daganatokban (LGD, HGD) a csoporton belüli metilált gének aránya sokkal nagyobb volt, mint CRC-ben.

A CRC-s és a mellette elhelyezkedő, szövettanilag ép (CN és F) minták összehasonlításakor az egészséges mintákhoz képest nem találtunk olyan gént (az összes mintában metilált 9 gént leszámítva), amely a szövettanilag ép mintákban és a CRC-s mintákban egyaránt metilált lett volna (8/A-D táblázat, 10. táblázat)

### 5.2. DNS-metilációs eltérést mutató gének validációja

A DNS-metiláció foka magasabb volt rákmegelőző állapotokban (LGD, HGD), mint CRCben (9. táblázat). Ennek a megfigyelésnek a megerősítésére CRC-s betegek olyan alcsoportját is megvizsgáltuk, akikben a rosszindulatú daganattal egyidejűleg (szinkron) szövettanilag LGD-nek bizonyult polip is előfordult. Ezekben a párokban is hasonló eredményre jutottunk: az LGD-s mintákban mind a metilált gének száma, mind a metiláció foka magasabb volt, mint a szinkron CRC-kben (12. ábra). További megerősítés céljából a restrikciós emésztésen alapuló módszer alkalmazása után 3 kiválasztott génen (*SFRP1, SFRP2, MAL*) célzott metilációspecifikus (biszulfit) PCR-vizsgálatot is végeztünk, amely az eredményeiket megerősítette (13. ábra).



12. ábra. Egy betegből származó szinkron LGD-s és CRC-s minták DNS-metilációs profilja hőtérképen ábrázolva. A metilált gének száma, valamint a metiláltsági foka LGD-ben magasabb, mint szinkron CRC-ben. Piros: metilált, zöld: nem metilált



13. ábra. Metilációspecifikus (biszulfit) PCR-vizsgálat eredményei. 3 kiválasztott génen célzott metilációspecifikus (biszulfit) PCR-vizsgálat olvadáspont-elemzését végeztük. A nem metilált (zöld görbe) és 100%-ban metilált (piros görbe) DNS standard mintákhoz képest látható az egyes minták eltérő metiláltsági foka.

CRC: I-III stádiumú vastag- és végbélrák

HGD: high-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

LGD: low-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

N: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél idősebb felnőttből

### 5.3. Colitis ulcerosás minták DNS-metilációs vizsgálata

4 szövettanilag aktív (UCa) és 4 szövettanilag inaktív (UCi) colitis ulcerosás mintát vizsgáltunk. Az egészséges mintákhoz képest a három csoport metilációs mintázatában nem találtunk különbséget (10. táblázat). Mind a három csoportban a már fent ismertett 9 gén (*BAGE, CCNA1, H19, MAGEA, MSX1, PTGIS, RUNX3, SPARC, UGT1A1*) metilációját tudtuk kimutatni (8/A táblázat).

### 5.4. DNS-metiláció, mRNS- és fehérjekifejeződés kapcsolatának vizsgálata

A DNS-metiláció transzkripciós és transzlációs hatásának vizsgálata céljából a Wnt-útvonal egy jól ismert antagonistáját, az SFRP1 gén kifejeződését vizsgáltuk mRNS- és fehérjeszinten, amely metilációs vizsgálatunk eredménye szerint az egyik leggyakrabban metilált génnek bizonyult. A génexpressziós vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy az SFRP1 gén hipermetilációja az mRNS- (14/A. ábra) és fehérjeszint (14/B. ábra) csökkenésével jár mind jóindulatú (LGD, HGD), mind rosszindulatú vastagbéldaganatokban (CRC). A génexpresszió vizsgálatakor az SFRP1-specifikus 4 Affymetrix próba (Affy ID) közül háromban (202035 s at, 202036 s at, 202037 s at) az egészséges mintákhoz viszonyítva szignifikánsan kisebb (p<0,05) mRNS-expressziót (14/A)kaptunk ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálattal egészséges mintákban erős, diffúz citoplazmatikus SFRP1 fehérjekifejeződést láttunk mind a strómában, mind az hámban (14/B. ábra). A stromában az SFRP1-pozitív sejtek az epiteliális sejtekhez közel helyezkedtek el.

LGD-s mintákban a hám SFRP1-expressziója csökkent, de a stromában az egészségeshez hasonló volt. HGD-ben a hám SFRP1-expressziójának csökkenése még kifejezettebb volt, mint LGD-ben. HGD-ben és CRC-ben az epitélium közelében stromális SFRP1-expresszió nem volt kimutatható.



14. ábra/A. SFRP1 gén mRNS-expressziós változása az adenoma-karcinóma szekvencia során. Az SFRP1 génhez tartozó négy Affymetrix próba közül háromban az egészséges (N) mintákhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent (202036\_s\_at, p<0,0001; 202035\_s\_at, p<0,02; 202037\_s\_at, p<0,0001) mRNS-expressziót kaptunk. B. SFRP1 fehérje expressziós változása az adenoma-karcinóma szekvencia során. SFRP1 fehérje epiteliális expressziója fokozatosan csökkent a normális-adenoma-karcinóma szekvencia során. A stromális fehérjeexpresszió egészséges és LGD betegekben megtartott volt, míg HGD-ben és CRC-ben csökkent. Vörös festés: SFRP1, kék festés: Hoechst magfestés. 40x nagyítás. N: egészséges minta, LGD: low-grade diszplázia, HGD: high-grade diszplázia, CRC: vastagbélrák</p>

### 5.5. KRAS és BRAF mutációinak és a mikroszatellita státusz vizsgálata

Az MMR fehérjék (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) immunhisztokémiai vizsgálata során valamennyi vizsgált mintában (n=40) megtartott fehérjeexpressziót találtunk, tehát a minták mikroszatellita stabilak voltak. A minták 25%-ában (n=10/40) fordult elő *KRAS* mutáció, 10%-ában (n=4/40) pedig *BRAF* V600E mutáció (11. táblázat).

11. táblázat. *KRAS* és *BRAF* mutációk vizsgálata egészséges felnőtt (N), low-grade diszpláziás (LGD), high-grade diszpláziás (HGD) és vastagbélrákos (CRC) mintákban

	n	MSS	%	KRAS c12	%	KRAS c13	%	BRAF V600E	%
N	20	20	100%	0	0	0	0	0	0
LGD	17	17	100%	4	24%	0	0	3	18%
HGD	6	6	100%	1	17%	0	0	1	17%
CRC	17	17	100%	4	24%	1	6%	0	0
Összes	40	40	100%	9	22,5%	1	2,5%	4	10%

# 5.6. 12 génes mutációs panel vizsgálata az adenoma-karcinóma szekvencia során és sessilis fogazott adenomákban

Mintáinkat egy a munkacsoportunk által kifejlesztett mutációs panel segítségével is megvizsgáltuk a vastagbélrákban gyakran előforduló 12 mutációra. A CRC-s mintákban a mutációk előfordulási aránya az egyes csoportokban a következő volt: *APC*: 29,4% (n=5/17); *TP53*: 52,9% (n=9/17); *KRAS*: 29,4% (n=5/17); *SMAD4*: 17,6% (n=3/17); *BRAF*: 5,9% (n=1/17). Hagyományos adenomákban (LGD és HGD) ugyanezek a mutációk egy kissé ritkábban fordultak elő: *APC*: 30,3% (n=7/23); *TP53*: 15,2% (n=4/23); *KRAS*: 21,7% (n=5/23); *SMAD4*: 4,3% (n=1/23); *BRAF*: 8,7% (n=2/23) (15/A. ábra). A leggyakoribb mutáció az *APC*-génben fordult elő, mutációi egyenlő mértékben fordultak elő adenomákban (30,3%) és CRC-ben (29,4%), valamint egy normal mintában is kimutathatóak voltak. Az adenoma csoporton belül az *APC*-mutációk a leggyakoribbak LGD-ben (30%, n=5/17) és HGD-ben (50%, n=3/6) voltak, míg fogazott adenomákban ritkábban (18%, n=2/11) voltak kimutathatóak (15/A. ábra). A csoportok közötti legnagyobb különbséget a *TP53* mutációiban láttuk: CRC-ben lényegesebb gyakoribb (52,9%) volt, mint adenomákban (15,2%). A *BRAF* mutációja a leggyakrabban fogazott adenomákban (18%, n=2/11) fordult elő (15/B. ábra). A fogazott és hagyományos adenomák között fontos különbségként mutattuk ki a *TP53* és

A fogazott és hagyományos adenomák között fontos különbségként mutattuk ki a *TP53* és *FBXW7* mutációját, amely jellegzetesen fogazott adenomákban volt kimutatható A *KRAS* és

SMAD4 mutációi kizárólag HGD-ben és LGD-ben fordultak elő, ugyanakkor mind a 4 gén mutációi előfordultak CRC-ben.



15. ábra. Mutációk százalékos gyakorisága az adenoma-karcinóma szekvencia során (A), valamint az egyes adenoma altípusokban (B).

AD-HGD: high-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

AD-LGD: low-grade diszpláziát tartalmazó adenoma

AD-serr: fogazott adenoma

CRC: vastag- és végbélrák

NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület

### 5.7. Fogazott polipok DNS-metilációs array vizsgálata

Az egészéges mintákkal való összehasonlításkor 9 olyan gént (BAGE, CCNA1, H19, MAGEA1, MGX1, PTGIS, RUNX3, SPARC, UGT1A1) találtunk, amely mindkét csoportban hipermetilált volt, hasonlóan a klasszikus, adenoma-karcinóma szekvencia útvonalon kifejlődő jó- és rosszindulatú daganatokhoz. Ezen felül 12 gén (CALCA, DKK2, GALR2, OPCML, PCDH10, SFRP1, SFRP2, SLIT3, SST, TAC1, VIM, WIF1) mind a 4 SSA-ban, 2

további gén (*BNC1* és *PDLIM4*) pedig 4-ből 3 SSA-ban (12. táblázat) volt hipermetilált, de egyik egészséges mintában sem. Két SSA-ban (SSA 1 és SSA 2) az *MLH1* gén metilációja mellett, *BRAF* mutációt és mikroszatellita instabilitást azonosítottunk. Az egyetlen TSA mintában az egészségeshez képest mindössze 2 gén (*CALCA* és *SST*) hipermetilációját tudtuk kimutatni. Ez a 2 gén mind az öt fogazott polipban (4 SSA, 1 TSA) metilált volt (12. táblázat).

12. táblázat. Fogazott polipok metilációs vizsgálata. met: metilált, nm: nem metilált, SSA: szesszilis fogazott adenoma, TSA: tradicionális fogazott adenoma

	SSA 1	SSA 2	SSA 3	SSA 4	TSA
APC	nm	nm	nm	met	nm
BNC1	met	nm	met	met	nm
CALCA	met	met	met	met	met
DKK2	met	met	met	met	nm
GALR2	met	met	met	met	nm
MGMT	nm	nm	nm	met	nm
MLH1	met	met	nm	nm	nm
OPCML	met	met	met	met	nm
PCDH10	met	met	met	met	nm
PDLIM4	nm	met	met	met	nm
SFRP1	met	met	met	met	nm
SFRP2	met	met	met	met	nm
SLIT3	met	met	met	met	nm
SST	met	met	met	met	met
TAC1	met	met	met	met	nm
VIM1	met	met	met	met	nm
WIF1	met	met	met	met	nm

# 5.8. A MutL homolog 1- (MLH1) és a secreted frizzled-related protein 1- (SFRP1) fehérje expressziójának vizsgálata fogazott polipokban

A mikroszatellita státuszt MLH1-fehérjeexpresszió segítségével immunhisztokémiai vizsgálattal határoztuk meg. A megtartott MLH1-fehérjeexpresszió (16/A. ábra) jól működő mismatch repair rendszerre és mikroszatellita stabilitásra utal, a csökkent MLH1-

fehérjeexpresszió (16/B. ábra) rosszul működő mismatch repair rendszert és mikroszatellita instabilitást jelez.

Azokban az SSA mintákban (SSA 1 és SSA 2), amelyekben az *MLH1* gén metilációját (12. táblázat) és *BRAF* mutációt is kimutattuk (13. táblázat), az MLH1 fehérje csökkent kifejeződése volt megfigyelhető (16/B. ábra), tehát ezeket a mintákat mikroszatellita instabilnak véleményeztük. A többi fogazott mintában (SSA3, SSA4, TSA és az egészséges minták) megtartott MLH1-fehérjekifejeződést (16/B. ábra), azaz mikroszatellita stabilitást észleltünk.

A DNS-metiláció fehérjeszintre való hatásának jellemzésére a metilált gének közül az *SFRP1*et választottuk, amely minden SSA mintában metilált volt. Az egészséges vastagbél mintákban, valamint a TSA mintában megtartott SFRP1-expressziót (16/C. ábra), míg az SSA mintákban csökkent fehérjeexpressziót találtunk (16/D. ábra).



16. ábra: MLH1- (a és b) és SFRP1- (c és d) fehérje expressziója egészséges (a és c) és SSA mintában (b és d). Az egészséges vastagbélmintában (a) megfigyelhető magi MLH1- fehérjeexpressziója eltűnik SSA mintában (b). Az egészséges vastagbélmintában (c) látható SFRP1-fehérjeexpresszió lecsökken SSA mintában (d). Nagyítás: 40x, mérték: 50 μm. SSA: szesszilis fogazott adenoma.

### 5.9. Fogazott polipok mutációvizsgálata

Az SSA 1 és SSA 2 minták (amelyekben az *MLH1* gén metilációját (12. táblázat) és a mikroszatellita instabilitást is kimutattuk), *BRAF* mutánsok voltak, egyéb mutációt azonban nem tudtunk kimutatni (13. táblázat). Az SSA 4-es mintában, amelyben a legtöbb metilált gént mutattuk ki (12. táblázat), három génben is találtunk mutációt (*APC, FBXW7, TP53*). Az SSA 3-as mintában, hasonlóan a TSA mintához a vizsgált 12 mutáció közül egyet sem mutattunk ki (13. táblázat). *KRAS* mutációt egy mintában sem találtunk (13. táblázat).

13. táblázat. Fogazott polipok mutációs vizsgálata. mut: mutált, SSA: szesszilis serrated adenoma, TSA: tradicionális serrated adenoma, wt: vad típus

	SSA 1	SSA 2	SSA 3	SSA 4	TSA
APC	wt	wt	wt	mut	wt
BRAF	mut	mut	wt	wt	wt
CTNNB1	wt	wt	wt	wt	wt
EGFR	wt	wt	wt	wt	wt
FBXW7	wt	wt	wt	mut	wt
KRAS	wt	wt	wt	wt	wt
MSH6	wt	wt	wt	wt	wt
NRAS	wt	wt	wt	wt	wt
<b>РІКЗСА</b>	wt	wt	wt	wt	wt
SMAD2	wt	wt	wt	wt	wt
SMAD4	wt	wt	wt	wt	wt
<i>TP53</i>	wt	wt	wt	mut	wt

# 5.10. A secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) mRNS-expresszió változása a CRC és NAT szövetben

A biopsziás (makrodisszektált) mintákban szignifikánsan (p<0,001) nagyobb *SFRP1* mRNSexpressziót találtunk a NAT mintákban, mint a CRC szövet esetében (17. ábra, 14. táblázat). Lézer mikrodisszekció után ugyancsak szignifikáns expressziós különbséget (p<0,001) találtunk két *SFRP1*-mRNS-transzkriptumban (202036\_s\_at, 202037\_s\_at) a NAT epitéliumban a CRC hámrétegéhez képest: a CRC mintákban az *SFRP1* mRNS átlag expresszió kb. harmada volt (38% és 36%) a NAT mintákban mért mRNS-expresszióhoz képest (17. ábra, 14. táblázat).



17. ábra. SFRP1 mRNS-expresszió változása a CRC és NAT szövetben a teljes szövetben
(A), a lézer mikrodisszektált hámban (B), lézer mikrodisszektált stromában (C). CRC: vastag- és végbélrák, NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület

# 5.11. A miofibroblasztok secreted frizzled-related protein 1- (SFRP1-)termelésének vizsgálata normális, daganathoz közeli ép (NAT) és vastagbélrákos (CRC) mintákban

Erős (+2) stromális SFRP1-fehérjekifejeződést találtunk a normális, a NAT, valamint a NAT és CRC területek közötti átmeneti területeken (transitional area, TA), amely nagyrészt a pericryptalis területekre koncentrálódott (18. ábra). Kettős fluoreszcens festés segítségével az itt található SFRP1-pozitív sejteket  $\alpha$ -SMA-pozitív miofibroblasztokként azonosítottunk. Mind az  $\alpha$ -SMA, mind az SFRP1 erős (score: +2) – közepes (score: +1), diffúz citoplazmatikus pozitivitást mutatott. A NAT területeken az SFRP1-proteinexpressziója magas volt az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek nagy részében (85,73%±12,61%) (18. ábra, 14. táblázat). Érdekes módon a pericryptalis miofibroblasztok megtartották erős SFRP1-expressziójukat, de a gyakorisága az  $\alpha$ -SMA-SFRP1 kettős pozitív sejteknek kisebb volt (72,32%±2,32%), mint a NAT területek esetén. A legtöbb CRC mintában heterogén SFRP1-expresszió volt látható, az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek aránya szignifikánsan nagyobb volt, bár az SFRP1 protein expresszió szignifikánsan csökkent (27,65%±18,27%) a NAT területekhez képest (p<0,001) (18. ábra, 14. táblázat).

A környező miofibroblasztok erős (+2) SFRP1-termeléséhez képest ép hámban, csökkent közepes (score: +1) SFRP1-expressziót láttunk. Csökkent SFRP1-expresszió volt megfigyelhető a NAT és TA területeken. Az epitelialis SFRP1-expresszió csökkenésével párhuzamosan a szubepitelialis miofibroblasztok megtartott SFRP1-expressziót mutattak. Azok a NAT területek, amelyek a tumortól messzebb helyezkedtek el a normálishoz hasonló epithelialis és stromális expressziós mintázatot mutattak. Csökkent gyenge (0) epitelialis SFRP1-expresszió volt látható a CRC minták többségében (71,42%) (19. ábra, 14. táblázat).



18. ábra. SFRP1-fehérjeexpresszió változása az α-SMA-pozitív miofibroblasztokban a NAT, a TA és a CRC területeken. SFRP1-fehérjeexpresszió (vörös immunfluoreszcens festés) teljes metszeten (A) a NAT (fehér nyíl), a TA (sárga nyíl) és a CRC (vörös nyíl) területen. Mind a NAT (9/9 esetben; B), mind TA (4/9 esetben; C) területen az α-SMA-pozitív miofibroblasztok (E, F) megtartott SFRP1-fehérjeexpressziót mutattak (85,73±12,61%) (B, C; egyesített képek: H, I). Ezekhez viszonyítva a legtöbb CRC-s mirigy körül az α-SMA-pozitív miofibroblasztok (vörös immunfluoreszcens festés; G) szignifikánsan (p<0.001) csökkent (27,65%±18,27%; 9/9 esetben) SFRP1-fehérjeexpressziót mutattak (D; egyesített kép: J). CRC: vastagbélrák, NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület, TA: átmeneti terület</li>



19. ábra. SFRP1-fehérjeexpresszió változása a vastagbélráktól való távolság függvényében. Az SFRP1-fehérjeexpresszió közel azonos а hámban és а subepitelialis miofibroblasztokban az ép területeken (A). A daganathoz közeledve a még ép (B, NAT), illetve a már átmeneti területen (TA, C) a hámban csökkent SFRP1-fehérjeexpressziót láttunk, de a szubepiteliális miofibroblasztokban a fehérje még kimutatható volt (vörös nyilak). A vastagbéldaganat területén azonban mind a hámban, mind a subepitelialis miofibroblasztokban csökkent SFRP1-fehérjeexpressziót észleltünk. NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület, TA: átmeneti terület

# 5.12. A secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) promóter hipermetiláció vizsgálata a NAT és a CRC területeken

Az α-SMA-pozitív stromális miofibroblasztok metilációs státuszát, NAT és CRC sejtekből származó laser mikrodisszektált sejteken vizsgáltuk. A NAT-ból származó stromális miofibroblasztokban nem, míg CRC-ből származó stromális miofibroblasztokban részleges (heterogén) *SFRP1*-hipermetilációt mutattunk ki metilációspecifikus (biszulfit) PCR-vizsgálattal. (20. ábra, 14. táblázat)



- 20. ábra. SFRP1 promóter hipermetiláció vizsgálata metilációspecifikus (biszulfit) PCR-rel a NAT és a CRC területeken. A. A nem metilált (0%) standard minta olvadási csúcshőmérséklete 77,1 °C volt, míg a 100%-osan metilált standardé 79,6 °C volt. B. NAT mintáknál (zöld) egy olvadási csúcsot, míg a daganatos mintáknál (T) két csúcsot láttunk, amely azok részleges (heterogén) metiláltságára utal. NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület, T: vastagbélrák.
- 14. táblázat. Az SFRP1 gén DNS-metilációs és mRNS-, valamint fehérjeexpressziós változásai a stromalis kompartmentben. CRC: vastagbélrák, LCM: lézer mikrodisszekció, NAT: tumor mellett elhelyezkedő szövettanilag ép terület.

	Vizsgált sejtek	NAT	CRC	р
mRNS-expresszió	stroma (LCM)	logFC <sub>CRC</sub>	- <sub>N</sub> = -2,23	p<0,001
1111113-220		n=38	n=38	
DNS motiláció	a SMA+ miafibrablasztak	0%	60%	
DNS-methacio		n=3/3	n=3/3	
fobárioovproceziá	<u>α-SMA+ és SFRP1+ sej</u> t	85,73%±12,61%	27,65%±18,27%	p<0,001
Tenerjeexpresszio	összes α-SMA+ sejt (LCM)	n=9/9	n=9/9	

#### 5.13. Demetilációs kezelés hatása a metilált gének kifejeződésére

Teljes genomiális mRNS-expressziós chip segítségével HT29 vastagbélrák sejtvonalon 7 metilált gén (*MAL, PCDH10, PDLIM4, SFRP1, SLIT2, SST, TMEFF2*) mRNS-expresszióját egészséges biopsziák adataival hasonlítottuk össze. A 7 gén a minták többségében csökkent mRNS-expressziót mutatott (21/A. ábra).

A metilációs folyamat reverzibilitásásnak bizonyításásra 5-aza-2'-deoxicitidin, demetilációs kezelést alkalmaztunk. A kezelést 3 párhuzamos kísérletben végeztük, amelynek expressziós változásait átlagoltuk. A kezelés hatására a 7 kiválaszott génben (*MAL, PCDH10, PDLIM4, SFRP1, SLIT2, SST, TMEFF2*) az expresszió részben visszaállítható volt (21/B. ábra). HCT116 vastagbélrák sejtvonalon végzett demetilációs kísérlet eredményeinek *in silico* elemzésekor a kiválasztott gének esetében hasonló változást figyeltünk meg (22. ábra).



21. ábra. 7 metilált gén mRNS-expressziós változása egészséges (N) és vastagbélrákos (CRC) biopsziákon (A), valamint ugyanezen gének expressziós vizsgálata HT29 (B), valamint HCT116 (C) sejtvonalakon 5-aza-2'-deoxicitidin, demetilációs kezelés hatására. A. Az egészségeshez viszonyítva, CRC-ben csökkent mRNS-expressziót találtunk. B. HT29 vastagbélrák sejtvonalon a demetilációs kezelés hatására az mRNS-expresszió részlegesen visszaállítható volt. Aza: 5-aza-2'-deoxicitidin, demetilációs kezelés, CRC: I-III stádiumú

vastag- és végbélrák, Normál: ép vastagbélnyálkahártya minta 18 évesnél idősebb felnőttből.



22. ábra. 5 metilált gén mRNS-expressziós változása HCT116 sejtvonalakon 5-aza-2'deoxicitidin, demetilációs kezelés hatására. HCT116 vastagbélrák sejtvonalon a demetilációs kezelés hatására az mRNS-expresszió részlegesen visszaállítható volt.

### 6. MEGBESZÉLÉS

PhD munkámban egészséges, gyulladásos, különböző adenoma és daganatos vastagbélszövet mintákban vizsgáltam DNS-metilációs eltéréseket, valamint ezek hatásait.

#### 6.1. DNS-metiláció vizsgálata az adenoma-karcinóma szekvencia során

Munkám első részében a hazánkban többségben előforduló (Fuszek és mtsai 2006, Patai és mtsai 2014) bal oldali vastagbéldaganatokra, illetve ezek rákmegelőző állapotaira koncentráltam, amelyek elsősorban a Vogelstein és mtsai által leírt, hagyományos, genetikai mutációk által előidézett adenoma-karcinóma útvonalon keresztül alakulnak ki (Vogelstein és mtsai 1988). A sporadikus CRC-k 80-85%-a tartozik ide, mikroszatellita-státuszukat tekintve stabilak (MSS). A CRC-k maradék 15-20%-a, mint már a bevezetésben részleteztük, a fogazott (serrated) polipokból fejlődik ki, és az előzőtől eltérően számos hipermetilált gént tartalmaz, ami alapján metilátor fenotípusnak (CpG island methylator phenotype, CIMP) is nevezik. Ezek a daganatok, különösen ha mikroszatellita instabilak (MSI), elsősorban a vastagbél jobb oldalán idősebbekben, nőkben fordulnak elő, ritkán adnak áttétet és nem reagálnak a CRC-ben adott 5-fluorouracil alapú kemoterápiára (Popat és mtsai 2005).

Tudomásom szerint munkacsoportunkon kívül kifejezetten CIMP-negatív vastagbéltumorok DNS-metilációs eltéréseivel eddig mindössze egy vizsgálat foglalkozott (An és mtsai 2010), ugyanakkor ez a munka csak néhány gént vizsgált, és nem foglalkozott rákmegelőző állapotokkal.

A molekuláris homogenitást erősítendő MSS CRC-ben, valamint rákmegelőző állapotaiban (LGD, HGD) 96 gén metiláltsági státuszát vizsgálva azonosítottunk egy 10 gyakran (az esetek több mint 85%-ban) metilált génből álló panelt (*SFRP1, SST, BNC1, MAL, SLIT2, SFRP2, SLIT3, ALDH1A3, TMEFF2, WIF1*). A 10 gén különböző biológiai funkciókkal rendelkezik, valamint 7 különböző kromoszómán van kódolva. Említésre méltó, hogy a jó és rosszindulatú vastag és végbélrákokban azonosított 10 gyakran metilált génből 3 (*SFRP1, SFRP2, WIF*) a Wnt útvonalban játszik szerepet, amely megerősíti ennek a jelátviteli útvonalnak kiemelt szerepét. Gén Ontológiai elemzéssel vizsgálva a 10 génből 4 (*SFRP1, SFRP2, SLIT2, SLIT3*) szerepet játszik a sejtnövekedés negatív regulációjában (GO:0030308). Emellett a 10-ből 5 gén (*SFRP1, SFRP2, SLIT2, SLIT3, SST*) az extracelluláris komponenshez (GO:0005615) kötődik, ami nemcsak a Wnt jelátvitel, hanem a vizsgált hám-stroma összehasonlítás vonatkozásában is érdekes lehet. Irodalmi adatokkal összevetve az itt azonosított 10-ből 6 gént (*SFRP1, MAL, TMEFF2, SLIT2, WIF1, SST*) downreguláltnak írtak le korai

gyomorrákban normál gyomorszövethez képest (Vecchi és mtsai 2007), amely esetlegesen felhívhatja a figyelmet egy általánosabb, közös mechanizmusra a daganatképződésben.

CRC-hez képest a rákmeglőző állapotokban több és nagyobb mértékben metilált gént találtunk, amikor szinkron LGD-CRC párokat hasonlítottunk össze. Ennek magyarázatára nem találtunk irodalmi adatokat, az adenomagenesis kutatása klinikai jelentősége ellenére meglepően mellőzött az irodalomban. Mivel a DNS izoláláshoz homogenizált mintákat használtunk, nem kizárható hogy egy rákmegelőző polip esetén több hiperproliferatív hám került az izolátumba, míg egy daganat esetén a stromális komponens is jelentősebb lehet. Ennek a fontos kérdésnek a pontos tisztázására csak lézerdisszektált mintákkal lehetne kielégítő választ adni, de ehhez szükséges kellőszámú sejt nyerése rendkívül munkaigényes folyamat.

Egy közelmúltban megjelent teljes genomot lefedő vizsgálat a vastagbél-adenomákat metilált génjeik száma alapján két, (sok illetve kevés metilált gént tartalmazó) csoportra osztotta (Luo és mtsai 2014). A fenti megfigyeléseket összegezve arra következtethetünk, hogy az epigenotípus kialakulása a daganatfejlődés során már az adenoma fázisban befejeződik.

A teljes genom illetve exom szekvenálás megjelenésével számos daganat (Lee és mtsai 2015), többek között a CRC lineáris evolúcióját is leírták. Kezdeti eseménynek az *APC* inaktiváló mutációját jelölik meg, amelyet a *KRAS/BRAF* aktiváló mutációi követnek. A *KRAS, NRAS* és *BRAF* driver mutációi megtalálhatóak mind a primer, mind a metasztatikus léziókban utalva ezzel arra, hogy ezek a mutációk korai események a daganatképződés folyamatában. Ezután a klonális expanzióhoz hozzájárulnak egyéb gének mutációi, is majd a metasztázisokban később új, más mutációk is megjelenhetnek. Érdekes kérdés, hogy hogyan illeszthető be ebbe a folyamatba a DNS-metiláció szerepe. Az epigenetikai mechanizmusok, így a DNSmetilációs is sokszor környezeti hatásokat (dohányzás, stressz, diéta) közvetítenek. Andrew Feinberg vetette fel először az epigenetikai progenitor elméletet, amely szerint a DNSmetiláció előbb az őssejteken, majd progenitor sejteken fejti ki hatását, majd az ún. gatekeeper mutáció hatására indul be a kóros proliferáció (Feinberg és mtsai 2006), majd egy tumorszuppresszor gén hipermetilációja képes epigenetikai plaszticitás révén az expanzióhoz hozzájárulni.

Az irodalomban egyre intenzívebben kutatott terület a tumor heterogenitás. Eltekintve az *SFRP1* gén vizsgálatától, ahol a tumor körüli területeket vizsgáltuk egy mintán belül, intratumoralis heterogenitást nem vizsgáltunk, amely azonban rendkívül fontos tényező CRC-ben (invazív front, budding), kedvezőtlen prognosztikai szerepét már kimutatták: a tumor heterogenitás foka egyenesen arányos a rossz prognózissal (Joung és mtsai 2017).

Az elmúlt közel másfél évtizedben az általunk leírt gének metilációs vizsgálatáról és annak eredményéről egyenként már találhatóak irodalmi adatok (15. táblázat), de ezekben a vizsgálatokban jellemzően lényegesen alacsonyabb metilációs értékeket figyeltek meg. Ennek oka valószínűleg a módszertani különbségekből (pl. eltérő primer szekvenciák, más CpG-szigetek, koraibb DNS-metiláció detekciós technológiák használata), esetleg a minták populációs különbözőségéből adódhatnak. Munkánkban nukleinsav-fixáló alkalmazása után - 80°C-on tárolt mintákat és restrikción alapuló valós idejű PCR-t használtunk, amely hozzájárulhatott az általunk tapasztalt magasabb érzékenységhez.

A többi daganatos (LGD, HGD, CRC) mintához képest metasztatikus CRC-ben (MCRC) kevesebb metilált gént találtunk. Ez az eredmény megerősítheti egy korábbi tanulmányt (Ju és mtsai 2011), amelyben az MCRC eltérő metilációs ujjlenyomattal rendelkezett a többi CRC-hez képest, feltételezik, hogy az MRCR-nek más lehet az epigenetikai evoluciója. Elképzelhető, hogy az MCRC-re jellemző metilált gének nem szerepeltek az általunk használt metilációs array-n, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Kimutattuk, hogy 7, a daganatos mintákban hipermetilált gén csökkent mRNS-expresszióval bírt, amely sejtkísérletben demetilációs kezeléssel részben visszaállítható volt. Ezek közül az SFRP1-t fehérjeszinten is megvizsgálva szintén csökkent expressziót láttunk daganatban az egészséges mintákhoz képest. Ez megegyezik korábbi vizsgálatok eredményével (Caldwell és mtsai 2004, Suzuki és mtsai 2004). Az SFRP-k a Wnt-jelátviteli útvonal jól ismert antagonistái. A Wnt-útvonal kóros aktivációja (pl. *APC* mutáció, béta-katenin transzlokáció) a vastagbéldaganat-képződés korai és gyakran előforduló eseménye (Cancer Genome Atlas Network 2012). Az SFRP1 hipermetilációja szintén egy korai és gyakori történés az adenoma-karcinóma útvonalon, amely munkacsoportunk eredményei alapján vérből is kimutatható (Barták és mtsai 2017), amely előrevetíti a CRC vér alapú, korai előszűrését.

15. táblázat. Saját DNS-metilációs eredményeink összehasonlítása korábbi egygénes vizsgálatokkal az adenoma-karcinóma szekvencia során. AD: adenoma, COBRA: Combined bisulfite restriction analysis, CRC: vastagbélrák, HGD: high-grade diszplázia, LGD: low-grade diszplázia, MSP: metilációspecifikus PCR, N: egészséges minta, PS: piroszekvenálás

	SAJ	ÁT EREI	DMÉNY	EINK		IRODALMI ADATOK (EGYGÉNES VIZSGÁLATOK)							
	Ν	LGD	HGD	CRC	LGD+HGD+CRC								
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%, n=40)	Referencia	N	%	AD	%	CRC	%	Módszer
SFRP1	0	100	100	94	97,5	Caldwell 2004	11/36	30%	n.a.		40/49	82%	MSP, COBRA
					,	Qi 2006	0/20	0%	29/33	88%	67/72	88%	MSP
SST	18	94	100	94	95	Mori 2006	n.a.		n.a.		30/34	88%	MSP
BNC1	18	100	100	88	95	Shames 2006	n.a.		10/24	42%	22/24	92%	MSP
MAL	0	100	83	88	92,5	Lind 2008	1/23	4%	45/63	71%	49/61	80%	MSP
SLIT2	7	100	100	82	92,5	Dallol 2003	n.a.		n.a.		23/32	72%	BS
SFRP2	0	82	100	94	90	Qi 2006	0/20	0%	27/33	82%	60/72	83%	MSP
SLIT3	0	94	100	76	87,5	Dickinson 2004	n.a.		n.a.		12/32	38%	COBRA
ALDH1A3	0	88	100	76	85	Shames 2006	n.a.		7/17	29%	11/24	46%	MSP
TMEFF2	0	94	83	76	85	Ebert 2005	1/21	5%	n.a.		36/47	71%	Methylight
WIF1	11	88	83	82	85	Taniguchi 2005	n.a.		32/44	73%	41/50	82%	MSP
PCDH10	4	88	83	76	82,5	Zhong 2013	n.a.		n.a.		68/80	85%	MSP
PDLIM4 (RIL)	11	82	100	76	82,5	Boumber 2007	1/22	5%	11/13	85%	30/43	70%	COBRA
VIM	0	82	83	76	80	Kann 2006	0/11	0%	25/50	50%	72/94	77%	MSP
GALR2	0	76	100	71	77,5	Chung 2008	0/20	0%	n.a.		17/20	85%	COBRA, PS
DKK2	7	88	100	59	77,5	Sato 2007	n.a.		n.a.		45/58	78%	MSP
<b>OPCML</b>	14	94	83	59	77,5	Cui 2008	n.a.		n.a.		17/18	94%	MSP
UCHL1	0	65	83	82	75	Okochi-Takada 2006	1/17	6%	n.a.		8/17	47%	MSP
						Mizukami 2008	n.a.		n.a.		36/49	73%	MSP

#### 6.2. DNS-metiláció vizsgálata colitis ulcerosában

A colitis ulcerosa (UC) a vastagbélrák jól ismert kockázati tényezője (Kinugasa és Akagi 2016). Az UC kórfejlődésében már korábban felvetették az epigenetikai tényezők szerepét, és felmerült, hogy a krónikus gyulladásos szövetben még a daganat kialakulása előtt hipermetilált gének találhatók (Niwa és Ushijima 2010). Az elmúlt 10 évben végzett vizsgálatokban UC-ben 25 hipermetilált gént azonosítottak (Gould és mtsai 2016), amelyeknek egy részét az UC-ból kialakult CRC-ben is leírták (Emmett és mtsai 2017). Ezek közül a *miR-1247* metilációja szignifikánsan korrelált (p=0,0006) a refrakter UC-vel, míg a *PAR2* metilációja a szteroiddependenciával mutatott összefüggést (p=0,007). Bár ezt vizsgálunkban nem tudtuk kimutatni, irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy az egészséges nyálkahártyától indulva, az aktív UC-n át az inaktív UC-ig a hipermetilált gének száma és a hipermetilált gént aktív és inaktív UC-ben, ami egyrészt abból adódhatott, hogy a fenti géneket nem vizsgáltuk, másrészt a vizsgálatunkban a gének pozitív metilációs státuszának a többi vizsgálathoz képest relatíve magas metilációs százalékot fogadtunk el.

A DNS-metiláció mértéke és a colitis ulcerosa fennállásának ideje között egyenes arányosság figyelhető meg (Tahara és mtsai 2017). Egy japán munkacsoport 5 miRNS (*MIR1, MIR9, MIR124, MIR137, MIR34B/C*) hipermetilációját vizsgálva megállapította, hogy azok metilációja colitis ulcerosához társult vastag- és végbélrákban (UC-CRC) az egészséges nyálkahártyától diszplázián keresztül az UC-CRC felé haladva fokozatosan nő, és ezek kombinációja kitűnően (szenzitivitás 100%, specificitás 96%) képes az UC-CRC-t az egészséges nyálkahártyától elkülöníteni (Toiyama és mtsai 2017). Talán ennél is fontosabb eredmény, hogy ennek az 5 markernek a kombinációja az érintett betegek egészséges végbél mintájából is képes (szenzitivitás 92%, negatív prediktív érték 97%) az UC-CRC előrejelzésére, amely a háttérjelenség (field effect) fontosságát húzza alá UC-CRC-ben. Ennek hátterében sporadikus CRC-hez viszonyítva, UC-CRC-ben található fokozott DNS-metiltranszferáz expresszió is állhat (Scarpa és mtsai 2016).

# 6.3. Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) gén- és fehérjeexpresszió összehasonlítása és a vizsgálata a háttérjelenségben (field effectben)

Kísérletünk során az SFRP1 szerepét vizsgáltuk a hám-stroma interakcióban, a NAT területek és a CRC összehasonlításban. Az SFRP1 fehérjetermelés legfőbb forrásának az  $\alpha$ -SMA-pozitív szubepiteliális miofibroblasztokat azonosítottuk a NAT területeken. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy ezeknek a sejteknek a promóter régiójában DNS-hipermetiláció nem mutatható ki. Erős ill. közepes SFRP1-expressziót találtunk az átmeneti területek (TA)  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtjeiben, amelyeket a normálistól még eltérő, de nem rákos kriptaszerkezetű területenként azonosítottunk, pl. kripták megnyúlása, pszeudostratifikácio, sejtpolaritás elvesztése, nukleáris polimorfizmus. Ezeken a területeken a hámban megfigyeltük az SFRP1 epigenetikai elcsendesítését, amely a háttérjelenség (field effect) korai jele lehet.

Feltételezzük, hogy az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtekből származó SFRP1-nek antiproliferatív parakrin hatása van, ami a NAT és a TA területeken csökkenti a háttérjelenséget, ugyanakkor a CRC-s területen az  $\alpha$ -SMA-pozitív subepitelialis miofibroblasztok támogathatják a daganatos sejtek proliferációját a Wnt-gátló jel, *SFRP1* epigenetikai elcsendesítésével.

*MGMT* génnel ellentétben, amelyet CRC makroszkópos környezetében hipermetiláltnak írtak le (Shen és mtsai 2005), a mi vizsgálatunkban az *SFRP1* DNS-metilációját csak a daganathoz mikroszkópikusan közeli (NAT) területeken tudtuk kimutatni, makroszkópos környezetében (F és CN) nem, azok a teljesen ép hámhoz hasonló metilációs mintázatot mutattak. Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy a mi mintáink mikroszatellita stabilak (MSS) voltak, míg az *MGMT* hipermetilációját elsősorban alacsony fokú mikroszatellita instabil (MSI-L) daganatokban írtak le (Whitehall és mtsai 2001), ahol a *KRAS* gén mutációja gyakrabban fordul elő.

A daganatos betegek szövettanilag ép nyálkahártyájában kimutatott DNS-metilációs eltérések lehetséges prediktív markerként is szolgálhatnak (Paun és mtsai 2010, Hiraoka és mtsai 2010). A korábbi vizsgálatok eredményeivel megegyezően úgy tűnik, hogy az epigenetikai háttérjelenség kialakításában elsősorban az öregedésben megfigyelt, úgynevezett A (*aging*) típusú metilált géneknek (ilyen az *SFRP1* is) van szerepe (Belshaw és mtsai 2008, Kawakami és mtsai 2011).

Munkám egyik konzekvens megfigyelése, hogy a vastagbéldaganat előrehaladtával az *SFRP1* gén hipermetilálódik, gén- és fehérjekifejeződése pedig csökken. Érdekes elméleti felvetés, hogy vajon az SFRP1 pótlása milyen hatással lenne a vastagbélrák sejtek biológiai funkcióira, képes lenne-e a Wnt útvonal gátlásán keresztül a daganat kialakulásának megelőzésére. Bár SFRP1

pótlásra kapcsolatos irodalmat nem találtam, nem emészthető szénhidrátokkal végzett vizsgálatokban azt találták, hogy azok az SFRP1 befolyásolásán keresztül képesek lehetnek a nem kissejtes tüdőrák kemoprevenciójára (Taguchi és mtsai 2016), bár a vastagbélrákban ezt nem sikerült kimutatni (Malcomson és mtsai 2015).

#### 6.4. DNS-metiláció vizsgálata fogazott polipokban

Bár a fogazott útvonalon kialakult polipok és daganatok kórfejlődésében a DNS-metiláció központi szerepet játszik, érdekes módon eddig meglehetősen kevés tanulmány foglalkozott a DNS-metiláció szerepével ebben a folyamatban. A *p16* (Kim és mtsai 2011) és az *IGFBP7* (Kaji és mtsai 2012) metilációját fontosnak tarják a HP – SSA átmenetben, valamint az *MLH1* metilációját az MSI-H CRC-k kialakulásában (Kim és mtsai 2011, Sakai és mtsai 2016). A korábbi vizsgálatok vagy egy gén metilációját írták le (Subramaniam és mtsai 2009, Beggs és mtsai 2013, Muto és mtsai 2014), vagy néhány jól jellemzett (általában CIMP marker) gént vizsgáltak (Park és mtsai 2003, Wynter és mtsai 2004, O'Brien és mtsai 2006, Kim és mtsai 2008).

Vizsgálatunkban számos új hipermetilált gént (*BNC1, SFRP1, SFRP2, SLIT3, SST, WIF1*) sikerült azonosítani SSA-ban. Ez a 6 gén ugyanakkor nemcsak fogazott polipokban, hanem hagyományos adenomákban és vastagbélrákban is hipermetilált volt.

Sakai és mtsai DNS-metilációs eltéréseket vizsgáltak fogazott polipokban (Sakai és mtsai 2016). SSA-ban magas fokú metilációt, míg TSA-ban közepes fokú metilációt találtak. Korábbi irodalmi adatoknak (O'Brien és mtsai 2006) megfelelően SSA-ban gyakran fordult elő *BRAF* mutáció, míg TSA-ban *KRAS* mutáció jelenléte volt jellemző, bár ennek a szenzitivitása és a specificitása meglehetősen szerény. Ezen a két gyakran vizsgált mutáción felül további 10, a klasszikus adenoma-karcinóma útvonalon előforduló mutációt is megvizsgáltunk, és bár a minták alacsony száma miatt messzemenő következtetést nem tudtunk levonni, úgy tűnik, hogy ezek a mutációk ritkán fordulnak elő a fogazott útvonalon, de természetesen ennek bizonyítására nagy esetszámú vizsgálatok szükségesek.

Korábbi megfigyeléseknek megfelelően, mi is kimutattuk, hogy az *MLH1* gén hipermetilációja az MLH1 fehérje kifejeződés következményes elvesztéséhez vezet. Újabb eredmények szerint az

*MLH1* gén hipermetilációja a fogazott útvonal korai eseménye, már HP-ben is előfordul, míg az MLH1 fehérje expresszió csökkenése csak jóval később következik be (Lee és mtsai 2016).

### 6.5. Mutációk és hipermetilált gének gyakoriságának összehasonlítása

Az egész genomra kiterjedő vizsgálatok alapján egyes daganatokban az ismert gének 5%-a metilálódhat a promóter régióban (Schuebel és mtsai 2007). Ha ezt összehasonlítjuk a mutációk számával, lényegesen kisebb számot (kb. 11 mutáció/daganat) kapunk (Sjöblom és mtsai 2006). Saját mintáinkban a fentiekkel egyezően lényegesen több hipermetilált gént tudtuk kimutatni, mint mutációt: 10 gén a minták több mint 85%-ban volt hipermetilált, míg a mutációk lényegesen ritkábbak voltak.

#### 6.6. Demetiláló kezelés és kezdeti klinikai eredmények szolid tumorokban

Sejtkísérletben kimutattuk, hogy 7, a daganatos mintákban hipermetilált gén csökkent mRNSexpressziója demetilációs kezeléssel (5-aza-2'-deoxicitidin, AZA) részben visszafordítható volt. Munkámban bemutatott két sejtvonalon végzett demetilációs kezelés nem teljesen azonos génexpressziós változást mutatott. Fontos azonban kiemelni, hogy az elérhető sejtkultúrák között molekuláris szempontból óriási különbségek vannak (Ahmed és mtsai 2013), nemcsak mutációkban, hanem sokkal inkább epigenetikai eltérésekben (DNS-metilációban). Természetesen több, heterogén sejtkultúra vizsgálata során nyert eredmények jobban általánosíthatóak lennének.

Az azacitidint (Vidaza) és az 5-aza-2'-deoxicitidin (decitabin, Dacogen) már évtizedek óta használják mielodiszpláziás szindrómás (MDS) betegek kezelésére. Az MDS a hemopoetikus őssejtek heterogén betegsége, ahol az elsősorban idős betegek társbetegségei miatt a kezelési lehetőségek korlátozottak, az egyetlen kuratív kezelés, az allogén csontvelő-transzplantáció, a legtöbb beteg számára nem lehetséges (Diesch és mtsai 2016). Az azacitidint kapó betegek túlélése egy fázis III vizsgálatban a standard kezeléshez képest közel 10 hónappal hosszabb volt (24,5 hónap vs 15 hónap) (Fenaux és mtsai 2009).

A nemzetközi szakirodalom meglehetősen szegényes a szolid tumorokban végzett demetilációs kezelésekkel kapcsolatban, a klinikai kísérletek eredményei eddig döntően csalódást keltőek

(Ramos és mtsai 2015). A demetiláló kezelést szolid daganatokban eddig csak fázis I és II vizsgálatokban tanulmányozták (Nervi és mtsai 2015): az alacsony dózisú decitabin citotoxikus szerekkel kombinálva közel 60%-os válaszarányt kaptak (Fan és mtsai 2014). Ma úgy gondolják, hogy 5-aza-2'-deoxicitidinnek nincs számottevő hatása a transzkripció szabályzására, valószínűleg azért, mert egy komplexebb rendszer részeként működik, így talán egyéb epigenetikai kezelésekkel (pl. hiszton-deacetiláz gátlószerek) kombinálva jobb eredményt lehet elérni. Kissejtes tüdőrákban alacsony dózisú azacitidin a HDAC-gátló, etinosztattal kombinálva a betegek egy csoportjában figyelemreméltó eredményt mutatott (Juergens és mtsai 2011), de a kis elemszám miatt, még felesleges lenne hosszútávú következtetéseket levonni.

### 6.7. DNS-metiláció klinikai alkalmazásának lehetőségei a vastagbélrákban: prescreening, prognózis, predikció (3P)

A tünetmentes (screening) populáció vastagbélrák szűrésének arany standard módszerének, a vastagbéltükrözésnek széleskörű alkalmazását elsősorban a rossz betegadherencia, a vizsgálattal járó kellemetlenségek a tünetmentes betegek körében jelentősen korlátozzák. Az alternatív, nem invazív módszereknek is számos hátránya van, pl. CT kolonoszkópia a kis polipokat nem detektálja, sugárterheléssel jár. A rutin klinikai gyakorlatban alkalmazott széklet okkult vér kimutatására szolgáló tesztek mérsékelt érzékenységük és fajlagosságuk miatt erre kevéssé alkalmasak, álpozitivitásuk miatt sok felesleges vizsgálatot generálnak, ugyanakkor gyakoriak az álnegatív esetek is, különösen a jobb oldali daganatok esetében, fogazott polipokra pedig érzéketlenek (Hewitson és mtsai 2008, Heigh és mtsai 2014). Emiatt olyan előszűrő (*prescreening*) módszerekre lenne szükség, amelyek megfelelő érzékenység és fajlagosság mellett képesek a tünetmentes betegek közül azok kiszűrésére, akiknek valójában vastagbéltükrözésre van szükségük, azaz nagy valószínűséggel rákmegelőző állapottal vagy daganattal rendelkeznek (Patai és mtsai 2012).

A vastagbéldaganatban gyakran előforduló metilált gének perifériás szövetekből (vérből vagy székletből) való ilyen célú alkalmazása kézenfekvőnek tűnik. Részben a keringésbe, részben a székletbe jutott hámsejtekből izolált DNS értékes forrás (Berger és Ahlquist 2012). Egy nemrég megjelent szisztematikus összefoglaló szerint számos marker (kombinációja) (Lam és mtsai 2016) használható lehet arra, hogy pozitivitás esetén felhívja a figyelmet a CRC (vagy rákmegelőző állapotai) veszélyére, így a beteg nagyobb hajlandósággal veti alá magát

vastagbéltükrözésnek. Elképzelésem szerint egy ilyen DNS-metilációs teszt kifejlesztésének lépései a következők lennének. Eset-kontroll vizsgálatokban, nagyáteresztő képességű módszerekkel olyan gének felfedezése, amelyek egyaránt a rákmegelőző állapotokban, valamint a rosszindulatú daganatokban is hipermetiláltak, azonban az egészséges és gyulladt nyálkahártyában nem. Az ily módon kiszűrt markereket (vagy azok optimális kombinációját) prospektív vizsgálatokban nagyobb mintaszámon, a mindennapi életben szűrő populáción (széklet okkult vérteszttel és vastagbéltükrözéssel együtt) is validálni kellene. Fontos lenne az alkalmazott módszerek közötti optimalizálás is.

A Mayo Klinikán kifejlesztett széklet DNS-t vizsgáló teszt az első tanulmányokban jó eredményt mutatott (Ahlquist és mtsai 2012), ugyanakkor elterjedésének a teszt körülményessége (pl. nagy mennyiségű széklet gyűjtése) határt szabhat. Munkacsoportunk is hozzájárult a metilált *SEPT9* gén vérmarker fejlesztéséhez, amely eset-kontroll tanulmányokban közel 100%-os érzékenységet mutatott (Tóth és mtsai 2012, Tóth és mtsai 2014). A kezdeti kiváló eredményeket tompította egy multicentrikus tanulmány, ahol közel 8 000 tünetmentes, 50 év feletti egyénben a *SEPT9* teszt csak 48%-os érzékenységgel tudta kimutatni a vastagbélrákot (Church és mtsai 2014), utalva arra, hogy további vizsgálatok szükségesek ideális marker(ek) megtalálására (Yi és mtsai 2012). Ehhez kiindulópontnak szolgálhatnak munkám eredményei is.

Ígéretes metilációs markernek tűnik a Syndecan 2 sejtmembrán fehérjét kódoló gén (*SDC2*) metilációjának vizsgálata. Egy koreai munkacsoport kimutatta, hogy a *SDC2* metilációja mind vérben (szenzitivitás 87%, specificitás 95%, Oh és mtsai 2013), mind székletben (szenzitivitás 90%, specificitás 90%, Oh és mtsai 2017) képes a vastagbélrákot az egészségestől elkülöníteni, sőt szintje székletben rákmegelőző állapotokban is szignifikánsan megnő (Oh és mtsai 2017). Munkacsoportunk metiláció specifikus PCR módszert használva, 4 korábban általunk már szövetben vizsgált gén (*PRIMA1, SFRP1, SFRP2, SDC2*) hipermetilációja 75-85%-ban igazolható volt perifériás vérből is adenomás mintákban, míg az egészséges kontroll csoportban ez csupán 10-15% volt (Barták és mtsai 2017).

DNS-metilációs markerek prognosztikai jelentőségét számos tanulmányban vizsgálták. A legtöbbet kutatott marker a *CDKN2A (p16)* volt, amely prognosztikai szerepét több mint tíz munkában tanulmányozták CRC-ben (Draht és mtsai 2018), azonban csak egy vizsgálatban mutatattak szignifikáns, rosszabb prognózist valamennyi TNM stádiumban (Bihl és mtsai 2012). A *TFAP2E* nevű transzkripciós faktor prognosztikai szerepének hipo-, valamint hipermetilációját

is vizsgálták, érdekes módon mind hipermetilációja (Zhang és mtsai 2014, Park és mtsai 2015), mind hipometilációja (Beggs és mtsai 2015) túlélési előnnyel járt. Az MSI-ben kulcsfontosságú szerepet játszó *MLH1* gén metilációjának prognózisra kifejtett szerepét hat vizsgálatban kutatták, ebből háromban találtak szignifikáns összefüggést: két vizsgálatban az *MLH1* hipermetilációja kedvező (Jensen és mtsai 2013, Miladi-Abdennadher és mtsai 2011), míg egy tanulmányban rosszabb prognózissal járt (Wang és mtsai 2012). A TSA-ból kiinduló MSI-L daganatokban fontos szerepet játszó *MGMT* gén metilációjának kedvező prognosztikai szerepét egy tanulmány szignifikánsnak találta (Nilsson és mtsai 2013), míg egy másik vizsgálatban az *MGMT* gén metilációját III-as és IV-es stádiumú betegek műtét utáni gyakoribb recidivájával hozták összefüggésbe (Kuan és mtsai 2015). A jelenleg egyetlen kereskedelmi forgalomban elérhető szérum metilációs teszt markere, a *SEPT9* gén metilációja egy vizsgálatban rosszabb túléléssel járt együtt (Tham és mtsai 2014), ugyanakkor ezt egy későbbi tanulmány nem tudta megerősíteni (Liu és mtsai 2016).

Történtek vizsgálatok a hipermetilált géneket halmozó, CpG-sziget metilátor fenotípus (CIMP) vastagbélrák altípussal is. Metasztatikus CRC-ben a CIMP egyértelműen rossz prognosztikai előrejelzőnek bizonyult (Cha és mtsai 2016). A közelmúltban egy koreai munkacsoportnak új metilációs markerek bevezetésével sikerült két olyan CIMP alcsoportot meghatározni, amelyek közül az egyik a többi CRC-nél jobb, a msáik pedig rosszabb prognózissal bírt (Bae és mtsai 2017). A CIMP-pel kapcsolatos munkák legfőbb korlátja, hogy nincsenek egységesen használt markerek, így az eredményeket is nehéz egymással összehasonlítani.

Néhány munkában több metilációs marker kombinációjának prognosztikai szerepét vizsgálták. Az *MLH1* és a *CDKN2A* együttes metilációja egy tanulmányban kedvező (Veganzones és mtsai 2015), ugyanakkor egy másik vizsgálatban ugyanezen két gén metilációja rosszabb prognózissal járt együtt IV-es stádiumú CRC-s betegekben (Aoyagi és mtsai 2011). 10 marker kombinációját tartalmazó panel (*ADAP1, BARHL2, CABLES2, DOT1L, ERAS, ESRG, RNF220, ST6GALNAC5, TAF4, SLC20A2*) két független kohortban is rosszabb prognózissal járt együtt (Gaedcke és mtsai 2014).

A fenti tanulmányoknak számos hátránya van: retrospektív, tercier, egyetemi vagy kutatóközpontokból származó adatgyűjtés, kis elemszám (<200 beteg), heterogén betegcsoportok (Draht és mtsai 2018). A sokszor egymásnak ellentmondó eredmények számos technikai okkal is magyarázhatóak, amelyek jelenleg a metilációs kutatások velejárói, és a különböző metilációs

módszerek standardizációjának hiányából is adódnak: eltérő DNS izoláló kitek, primerek, reagensek, protokollok és különböző DNS-metilációs detekciós módszerek használata (van Vlodrop és mtsai 2011, Draht és mtsai 2016). A fentiekből is látszik, hogy a DNS metiláció CRC-ben betöltött prognosztikai szerepéről jelenleg még nem tudunk egyértelmű következtetést levonni, ennek vizsgálatához jól tervezett, nagy elemszámú, prospektív, standardizált módszereket használó, egymástól független betegcsoportokat vizsgáló tanulmányok szükségesek.

A daganatos betegségek kezelésében a kemoterapeutikumokra bekövetkező hatásvesztés (kemorezisztencia) gyakori probléma, ezért ennek előjelzésére alkalmas (prediktív) biomarkerek azonosítása létfontosságú. Nagy érdeklődést váltott ki az a közelmúltban publikált, több mint 200 beteget magába foglaló multicentrikus tanulmány, amelyben egy transzkripciós faktort kódoló gén (*TFAP2E*) metilációja sikeresen előrejelezte a vastagbélrák kemoterápiájában alapszernek számító 5-fluorouracilra való kemorezisztenciát (Ebert és mtsai 2012). Később kimutatták, hogy a *TFAP2E* metilációja *BRAF* mutációval és rosszabb prognózissal is együttjár (Beggs és mtsai 2015).

A DNS-metiláció a vastagbéldaganatokban és rákmegelőző állapotaiban gyakran előforduló eltérés. Pontosabb ismerete nemcsak a vastagbélrák kialakulásának megértésében segíthet, hanem megfelelő markerek esetén a vastagbélrák korai felismerésében, kórjóslatának és a kezelésre adott válasz felmérésében is segíthet.
# 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során 96 tumorfejlődéshez kapcsolt, tumorszupresszor gén DNS-metilációs státuszának vizsgálatával sikerült egy olyan 10 génből (*SFRP1, SST, BNC1, MAL, SLIT2, SFRP2, SLIT3, ALDH1A3, TMEFF2, WIF1*) álló panelt azonosítani, amely a rákmegelőző (tubuláris adenoma, fogazott adenomák) és vastagbélrákos szöveti mintákat az egészséges, a gyulladásos valamint a CRC melletti egészséges mintáktól elkülönítette.

A talált metilált gének mRNS-expresszióját teljes genom expressziós microarray módszerrel meghatározva 7 génnél csökkent mRNS-expressziót mutattunk ki.

Sejtkultúra-kísérletekben demetilációs kezelés hatására a 7 kiválaszott metilált gén csökkent expressziója részben visszaállítható volt.

Fogazott adomákban is megvizsgáltuk a fenti 96 tumorszuppresszor gén metilációját, és eredményeink alapján 12 gén (*CALCA, DKK2, GALR2, OPCML, PCDH10, SFRP1, SFRP2, SLIT3, SST, TAC1, VIM, WIF1*) az összes vizsgált SSA mintában hipermetilált volt az egészséges mintákhoz képest. Az egyetlen vizsgált TSA mintában mindössze 2 gén (*CALCA* és *SST*) metilációját tudtuk kimutatni, ez a 2 gén azonban mind az öt fogazott polipban hipermetilált volt. Csökkent MLH1 fehérjeexpressziót, így mikroszatellita instabilitást találtunk 2 SSA mintában, amely mintákban az *MLH1* gén is metilált volt, valamint a *BRAF* mutációját is kimutattunk. A minden SSA mintában metilált *SFRP1* gént fehérjeszinten vizsgálva az SSA mintában csökkent fehérjeexpressziót találtunk, míg az egészséges vastagbélmintákban, valamint a TSA mintában megtartott SFRP1-expressziót észleltünk. A vizsgált 12 mutáció közül a fogazott polipokban szintén keveset (0-3) találtunk mintánként. Az SFRP1 fehérjetermelés legfőbb forrásának az α-SMA-pozitív szubepiteliális miofibroblasztokat azonosítottuk a daganathoz közeli szövettanilag ép (NAT) területeken. Ezeknek az α-SMA-pozitív szubepiteliális miofibroblasztoknak az *SFRP1* promóter régiójában DNS-hipermetiláció (a hámsejtekkel ellentétben) nem volt kimutatható, amely a háttérjelenség (field effect) korai jele lehet.

# 8. ÖSSZEFOGLALÁS

96 gén metiláltsági státuszát vizsgálva MSS CRC-ben, valamint rákmegelőző állapotaiban (LGD, HGD) azonosítottunk egy 10 gyakran (az esetek több mint 85%-ban) metilált génből álló panelt (*SFRP1, SST, BNC1, MAL, SLIT2, SFRP2, SLIT3, ALDH1A3, TMEFF2, WIF1*). CRC-hez képest a rákmeglőző állapotokban több és nagyobb mértékben metilált gént találtunk, amikor szinkron LGD-CRC párokat hasonlítottunk össze.

A többi daganatos (LGD, HGD, CRC) mintához képest metasztatikus CRC-ben (MCRC) kevesebb metilált gént találtunk.

Kimutattuk, hogy 7, a daganatos mintákban hipermetilált gén csökkent mRNS expresszióval bírt, amely sejtkísérletben demetilációs kezeléssel részben visszaállítható volt. Ezek közül az SFRP1-t fehérjeszinten is megvizsgálva szintén csökkent expressziót láttunk daganatban az egészséges mintákhoz képest.

Mutációk gyakoriságával összehasonlítva a hipermetilált gének lényegesebb gyakrabban voltak kimutathatóak vastagbélrákban és rákmegelőző állapotaiban: a 10 leggyakrabban hipermetilált gén a minták több mint 85%-ban kimutatható volt, míg a leggyakoribb mutációk előfordulása 0-50% között volt.

Vizsgálatunkban számos új hipermetilált gént (*BNC1, SFRP1, SFRP2, SLIT3, SST, WIF1*) sikerült azonosítani SSA-ban. Ez a 6 gén ugyanakkor nemcsak fogazott polipokban, hanem hagyományos adenomákban és vastagbélrákban is hipermetilált volt.

#### 9. SUMMARY

In my doctoral thesis, the methylation status of 96 genes were analyzed. Our results indicate that there is a characteristic methylation pattern for MSS CRCs, but also for their precursor lesions. We identified a set of 10 genes (*SFRP1, SST, BNC1, MAL, SLIT2, SFRP2, SLIT3, ALDH1A3, TMEFF2, WIF1*) that are frequently hypermethylated in benign and malignant colorectal tumors. More interestingly precursor lesions had more hypermethylated genes and a higher grade of methylation than CRC, when synchronous LGD and CRC pairs were compared. We confirmed that metastatic CRCs have a different methylation fingerprint, as most of the genes hypermethylated in precancerous and cancerous lesions were not methylated in MCRC.

We showed that 7 hypermethylated genes had decreased mRNA expression in tumorous samples, and this decreased mRNA expression could be partly restored by demethylation treatment.

Among these, SFRP1 was analyzed also at the protein level and showed decreased protein expression compared to healthy samples.

When the frequency of mutations and hypermethylated genes in tumorous samples was compared, methylated genes showed a significantly higher penetrance than mutations. We identified 10 genes that were hypermethylated in more than 85% of the examined samples, whereas the frequency of the most common mutations was less (0-50%).

6 genes (*BNC1*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SLIT3*, *SST*, *WIF1*) were found to be frequently hypermethylated not only in CRC, but in both traditional and serrated pre-neoplastic lesions, that warrants further investigation with larger sample size.

# 10. LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Kutatásunk során 96 előre kiválasztott gén egyidejű DNS-metilációs státuszának vizsgálatával sikerült egy olyan 10 génből álló panelt találni, amely a rákmegelőző (adenoma tubulare, fogazott adenomák) és vastagbélrákos szöveti mintákat az egészséges, a gyulladásos valamint a CRC melletti egészséges mintáktól elkülönítette.

2. A talált metilált gének mRNS-expresszióját teljes genom expressziós chippel meghatározva 7 génnél csökkent mRNS-expressziót mutattunk ki.

3. Sejtkultúra-kísérletekben demetilációs kezelés hatására a 7 kiválaszott metilált gén csökkent expressziója részben visszaállítható volt.

4. A vastagbélrák kialakulásában gyakran szerepet játszó 12 gén mutációja, ritkábban fordul elő, mint a DNS-metiláció.

5. Az SFRP1 fehérjetermelés legfőbb forrásának az α-SMA-pozitív szubepiteliális miofibroblasztokat azonosítottuk a daganathoz közeli szövettanilag ép (NAT) területeken.

6. Ezeknek az α-SMA-pozitív szubepiteliális miofibroblasztoknak az *SFRP1* promóter régiójában DNS-hipermetiláció (a hámsejtekkel ellentétben) nem volt kimutatható, amely a háttérjelenség (field effect) korai jele lehet.

#### 11. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, Mahoney DW, Yab TC, Taylor WR, Butz ML, Thibodeau SN, Rabeneck L, Paszat LF, Kinzler KW, Vogelstein B, Bjerregaard NC, Laurberg S, Sorensen HT, Berger BM, Lidgard GP. (2012) Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. Gastroenterology, 142: 248-256.
- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknas M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis, 2: e71.
- 3. An B, Kondo Y, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Sawaki A, Tajika M, Nakamura T, Yamao K, Yatabe Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Tani T, Matsuo K, Shen L, Issa JP, Sekido Y. (2010) Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. Int J Cancer, 127: 2095-2105.
- Aoyagi H, Iida S, Uetake H, Ishikawa T, Takagi Y, Kobayashi H, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K (2011). Effect of classification based on combination of mutation and methylation in colorectal cancer prognosis. Oncol Rep, 25: 789-794.
- Arain MA, Sawhney M, Sheikh S, Anway R, Thyagarajan B, Bond JH, Shaukat A. (2010) CIMP status of interval colon cancers: another piece to the puzzle. Am J Gastroenterol, 105: 1189-1195.
- 6. Arányi T, Tusnády GE. (2007) BiSearch: ePCR tool for native or bisulfite-treated genomic template. Methods Mol Biol, 402: 385-402.
- Aust DE, Baretton GB; Members of the Working Group GI-Pathology of the German Society of Pathology. (2010) Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)proposal for diagnostic criteria. Virchows Arch, 457: 291-297.
- Bae JM, Kim JH, Kwak Y, Lee DW, Cha Y, Wen X, Lee TH, Cho NY, Jeong SY, Park KJ, Han SW, Lee HS, Kim TY, Kang GH. (2017) Distinct clinical outcomes of two CIMP-positive colorectal cancer subtypes based on a revised CIMP classification system. Br J Cancer, 116: 1012-1020.

- Barták BK, Kalmár A, Péterfia B, Patai ÁV, Galamb O, Valcz G, Spisák S, Wichmann B, Nagy ZB, Tóth K, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2017) Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. Epigenetics, 12: 751-763.
- Beggs AD, Jones A, Shepherd N, Arnaout A, Finlayson C, Abulafi AM, Morton DG, Matthews GM, Hodgson SV, Tomlinson IP. (2013) Loss of expression and promoter methylation of SLIT2 are associated with sessile serrated adenoma formation. PLoS Genet, 9: e1003488.
- Beggs AD, Dilworth MP, Domingo E, Midgley R, Kerr D, Tomlinson IP, Middleton GW. (2015) Methylation changes in the TFAP2E promoter region areassociated with BRAF mutation and poorer overall & disease free survival in colorectal cancer. Oncoscience, 2: 508-516.
- 12. Belshaw NJ, Elliott GO, Foxall RJ, Dainty JR, Pal N, Coupe A, Garg D, Bradburn DM, Mathers JC, Johnson IT. (2008) Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. Br J Cancer, 99: 136-142.
- 13. Berger BM, Ahlquist DA. (2012) Stool DNA screening for colorectal neoplasia: biological and technical basis for high detection rates. Pathology, 44: 80-88.
- 14. Bihl MP, Foerster A, Lugli A, Zlobec I. (2012) Characterization of CDKN2A(p16) methylation and impact in colorectal cancer: systematic analysis using pyrosequencing. J Transl Med, 10: 173.
- 15. Bird A. (1992) The essentials of DNA methylation. Cell, 70: 5-8.
- Boland CR, Goel A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology, 138: 2073-2087.
- 17. Boumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L, Gharibyan V, Konishi K, Estey E, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Issa JP. (2007) RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. Cancer Res, 67: 1997-2005.
- Bouwens MW, Winkens B, Rondagh EJ, Driessen AL, Riedl RG, Masclee AA, Sanduleanu S. (2013) Simple clinical risk score identifies patients with serrated polyps in routine practice. Cancer Prev Res (Phila), 6: 855-863.

- 19. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy RG, Byrd P, Chughtai S, Wallis Y, Matthews GM, Morton DG. (2004) The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. Cancer Res, 64: 883-888.
- 20. Cancer Genome Atlas Network. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature, 487: 330-337.
- 21. Cha Y, Kim KJ, Han SW, Rhee YY, Bae JM, Wen X, Cho NY, Lee DW, Lee KH, Kim TY, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Jeong SY, Park KJ, Kang GH, Kim TY. (2016) Adverse prognostic impact of the CpG island methylator phenotype in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer, 115: 164-171.
- 22. Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M, Jelinek J, Shen L, Yu Y, Issa JP. (2008) Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. PLoS One, 3: e2079.
- 23. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF, PRESEPT Clinical Study Steering Committee, Investigators and Study Team. (2014) Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. Gut, 63: 317-325.
- 24. Cui Y, Ying Y, van Hasselt A, Ng KM, Yu J, Zhang Q, Jin J, Liu D, Rhim JS, Rha SY, Loyo M, Chan AT, Srivastava G, Tsao GS, Sellar GC, Sung JJ, Sidransky D, Tao Q. (2008) OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation. PLoS One 2008, 3: e2990.
- 25. Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. (2003) SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. Cancer Res, 63: 1054-1058.
- 26. Dickinson RE, Dallol A, Bieche I, Krex D, Morton D, Maher ER, Latif F. (2004) Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. Br J Cancer, 91: 2071-2078.
- 27. Diesch J, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Götze KS. (2016) A clinicalmolecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. Clin Epigenetics, 8: 71.

- 28. Draht MX, Smits KM, Jooste V, Tournier B, Vervoort M, Ramaekers C, Chapusot C, Weijenberg MP, van Engeland M, Melotte V. (2016) Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. Clin Epigenetics, 8: 44.
- 29. Draht MXG, Goudkade D, Koch A, Grabsch HI, Weijenberg MP, van Engeland M, Melotte V, Smits KM. (2018) Prognostic DNA methylation markers for sporadic colorectal cancer: a systematic review. Clin Epigenetics, 2018, 10: 35.
- 30. Ebert MP, Mooney SH, Tonnes-Priddy L, Lograsso J, Hoffmann J, Chen J, Röcken C, Schulz HU, Malfertheiner P, Lofton-Day C. (2005) Hypermethylation of the TPEF/HPP1 gene in primary and metastatic colorectal cancers. Neoplasia, 7: 771-778.
- 31. Ebert MP, Tänzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, Tetzner R, Lofton-Day C, Rosenberg R, Reinacher-Schick AC, Schulmann K, Tannapfel A, Hofheinz R, Röcken C, Keller G, Langer R, Specht K, Porschen R, Stöhlmacher-Williams J, Schuster T, Ströbel P, Schmid RM. (2012) TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. N Engl J Med, 66: 44-53.
- 32. Emmett RA, Davidson KL, Gould NJ, Arasaradnam RP. (2017) DNA methylation patterns in ulcerative colitis-associated cancer: a systematic review. Epigenomics, 9: 1029-1042.
- 33. Fan H, Lu X, Wang X, Liu Y, Guo B, Zhang Y, Zhang W, Nie J, Feng K, Chen M, Zhang Y, Wang Y, Shi F, Fu X, Zhu H, Han W. (2014) Low-dose decitabine-based chemoimmunotherapy for patients with refractory advanced solid tumors: a phase I/II report. J Immunol Res, 2014: 371087.
- 34. Fearon ER. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. Annu Rev Pathol, 6: 479-507.
- 35. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet, 7: 21-33.
- 36. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR; International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of

conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol, 10: 223-232.

- 37. Fidalgo C, Santos L, Rosa I, Fonseca R, Lage P, Claro I, Chaves P, Dias Pereira A. (2014) Hyperplastic polyp? Look again... the impact of the new classification for serrated polyps. Acta Med Port, 27: 304-348.
- 38. Fuszek P, Horvath HC, Speer G, Papp J, Haller P, Fischer S, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Hitre E, Lakatos PL. (2006) Location and age at onset of colorectal cancer in Hungarian patients between 1993 and 2004. The high number of advanced cases supports the need for a colorectal cancer screening program in Hungary. Anticancer Res, 26: 527-531.
- 39. Gaedcke J, Leha A, Claus R, Weichenhan D, Jung K, Kitz J, Grade M, Wolff HA, Jo P, Doyen J, Gérard JP, Johnsen SA, Plass C, Beißbarth T, Ghadimi M. (2014) Identification of a DNA methylation signature to predict disease-free survival in locally advanced rectal cancer. Oncotarget, 5: 8123-8135.
- 40. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR. (2007) The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. Gastroenterology, 132: 127-138.
- Gould NJ, Davidson KL, Nwokolo CU, Arasaradnam RP. (2016) A systematic review of the role of DNA methylation on inflammatory genes in ulcerative colitis. Epigenomics, 8: 667-684.
- 42. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature, 446: 153-158.

- 43. Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, Labropoulos S, Vasilaki M, Kosmidis P, Saetta A, Mihalatos M, Nasioulas G. (2001) A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. Mol Cell Probes, 15: 243–247.
- 44. Hazewinkel Y, de Wijkerslooth TR, Stoop EM, Bossuyt PM, Biermann K, van de Vijver MJ, Fockens P, van Leerdam ME, Kuipers EJ, Dekker E. (2014) Prevalence of serrated polyps and association with synchronous advanced neoplasia in screening colonoscopy. Endoscopy, 46: 219-224.
- 45. Heigh RI, Yab TC, Taylor WR, Hussain FT, Smyrk TC, Mahoney DW, Domanico MJ, Berger BM, Lidgard GP, Ahlquist DA. (2014) Detection of colorectal serrated polyps by stool DNA testing: comparison with fecal immunochemical testing for occult blood (FIT). PLoS One, 9: e85659.
- 46. Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. (2008) Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. Am J Gastroenterol, 103: 1541-1549.
- 47. Higuchi T, Sugihara K, Jass JR. (2005) Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. Histopathology, 47: 32-40.
- 48. Hiraoka S, Kato J, Horii J, Saito S, Harada K, Fujita H, Kuriyama M, Takemoto K, Uraoka T, Yamamoto K. (2010) Methylation status of normal background mucosa is correlated with occurrence and development of neoplasia in the distal colon. Hum Pathol, 41: 38-47.
- 49. Huang CS, Farraye FA, Yang S, O'Brien MJ. (2011) The clinical significance of serrated polyps. Am J Gastroenterol, 106: 229-240.
- 50. Jensen LH, Rasmussen AA, Byriel L, Kuramochi H, Cruger DG, Lindebjerg J, Danenberg PV, Jakobsen A, Danenberg K. (2013) Regulation of MLH1 mRNA and protein expression by promoter methylation in primary colorectal cancer: a descriptive and prognostic cancer marker study. Cell Oncol (Dordr), 36: 411-419.
- Jones PA, Baylin SB. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet, 3:415-428.

- 52. Joung JG, Oh BY, Hong HK, Al-Khalidi H, Al-Alem F, Lee HO, Bae JS, Kim J, Cha HU, Alotaibi M, Cho YB, Hassanain M, Park WY, Lee WY. (2017) Tumor Heterogeneity Predicts Metastatic Potential in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res, 23: 7209-7216.
- 53. Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y. (2011) Distinct profiles of epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. Am J Pathol, 178: 1835-1846.
- 54. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, Lee B, Tsai S, Delgado IE, Rudek MA, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Brock MV, Rudin CM. (2011) Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. Cancer Discov, 1: 598-607.
- 55. Kaji E, Uraoka T, Kato J, Hiraoka S, Suzuki H, Akita M, Saito S, Tanaka T, Ohara N, Yamamoto K. (2012) Externalization of saw-tooth architecture in small serrated polyps implies the presence of methylation of IGFBP7. Dig Dis Sci, 57:1261-1270.
- 56. Kann L, Han J, Ahlquist D, Levin T, Rex D, Whitney D, Markowitz S, Shuber A. (2006) Improved marker combination for detection of de novo genetic variation and aberrant DNA in colorectal neoplasia. Clin Chem, 52: 2299-2302.
- 57. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G, Iacopetta B. (2006) DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. Br J Cancer, 94: 593-598.
- 58. Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Bleday R, Willett WC. (1995) Diet, alcohol, and smoking and the occurrence of hyperplastic polyps of the colon and rectum (United States). Cancer Causes Control, 6: 45-56.
- 59. Kim YH, Kakar S, Cun L, Deng G, Kim YS. (2008) Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. Int J Cancer, 123: 2587-2593.
- 60. Kim KM, Lee EJ, Ha S, Kang SY, Jang KT, Park CK, Kim JY, Kim YH, Chang DK, Odze RD. (2011) Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. Am J Surg Pathol, 35: 1274-1286.

- 61. Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. (2012) A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. Am J Gastroenterol, 107: 460-469.
- 62. Kinugasa T, Akagi Y. (2016) Status of colitis-associated cancer in ulcerative colitis. World J Gastrointest Oncol, 8: 351-357.
- 63. Kohli RM, Zhang Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature, 502: 472-479.
- 64. Kuan JC, Wu CC, Sun CA, Chu CM, Lin FG, Hsu CH, Kan PC, Lin SC, Yang T, Chou YC. (2015) DNA methylation combinations in adjacent normal colon tissue predict cancer recurrence: evidence from a clinical cohort study. PLoS One, 10: e0123396.
- 65. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, Medema JP, Kandimalla R. (2016) DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. Biochim Biophys Acta, 1866: 106-120.
- 66. Lee EJ, Chun SM, Kim MJ, Jang SJ, Kim DS, Lee DH, Youk EG. (2016) Reappraisal of hMLH1 promoter methylation and protein expression status in the serrated neoplasia pathway. Histopathology, 69: 198-210.
- 67. Lee JY, Yoon JK, Kim B, Kim S, Kim MA, Lim H, Bang D, Song YS. (2015) Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an epithelial ovarian cancer investigated using next-generation sequencing. BMC Cancer, 15: 85.
- 68. Lind GE, Ahlquist T, Kolberg M, Berg M, Eknaes M, Alonso MA, Kallioniemi A, Meling GI, Skotheim RI, Rognum TO, Thiis-Evensen E, Lothe RA. (2008) Hypermethylated MAL gene a silent marker of early colon tumorigenesis. J Transl Med, 6: 13.
- 69. Liu Y, Chew MH, Tham CK, Tang CL, Ong SY, Zhao Y. (2016) Methylation of serum SST gene is an independent prognostic marker in colorectal cancer. Am J Cancer Res, 6: 2098-2108.
- 70. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. (1990) Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. Am J Surg Pathol, 14: 524-537.

- 71. Luo Y, Wong CJ, Kaz AM, Dzieciatkowski S, Carter KT, Morris SM, Wang J, Willis JE, Makar KW, Ulrich CM, Lutterbaugh JD, Shrubsole MJ, Zheng W, Markowitz SD, Grady WM. (2014) Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. Gastroenterology, 147: 418-429.
- 72. Malcomson FC, Willis ND, Mathers JC. (2015) Is resistant starch protective against colorectal cancer via modulation of the WNT signalling pathway? Proc Nutr Soc, 74: 282-291.
- 73. Markowitz SD, Bertagnolli MM. (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med, 361: 2449-2460.
- 74. Merok MA, Ahlquist T, Røyrvik EC, Tufteland KF, Hektoen M, Sjo OH, Mala T, Svindland A, Lothe RA, Nesbakken A. (2013) Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. Ann Oncol, 24: 1274-1282.
- 75. Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Damak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L, Frikha M, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. (2011) Aberrant methylation of hMLH1 and p16INK4a in Tunisian patients with sporadic colorectal adenocarcinoma. Biosci Rep, 31: 257-2564.
- 76. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. (2016) Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA Cancer J Clin, 66: 271-89.
- 77. Mizukami H, Shirahata A, Goto T, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K. (2008) PGP9.5 methylation as a marker for metastatic colorectal cancer. Anticancer Res, 28: 2697-2700.
- 78. Mori Y, Cai K, Cheng Y, Wang S, Paun B, Hamilton JP, Jin Z, Sato F, Berki AT, Kan T, Ito T, Mantzur C, Abraham JM, Meltzer SJ. (2006) A genome-wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin, tachykinin-1, and 5 other genes in colon cancer. Gastroenterology, 131: 797-808.
- 79. Morimoto LM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bostick RM, Lais CJ, Potter JD. (2002) Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 11: 1012-1018.

- 80. Muto Y, Maeda T, Suzuki K, Kato T, Watanabe F, Kamiyama H, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F, Alonso S, Perucho M, Rikiyama T. (2014) DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. BMC Cancer, 14: 466.
- 81. Nemzeti Rákregiszter. Elérhető: <u>http://www.onkol.hu/hu/rakregiszter-statisztika</u>. Elérve 2017.08.01.
- 82. Nervi C, De Marinis E, Codacci-Pisanelli G. (2015) Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials. Clin Epigenetics, 7: 127.
- Niehrs C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 13: 767-779.
- 84. Nilsson TK, Lof-Ohlin ZM, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. Int J Oncol, 42: 127-133.
- 85. Niwa T, Ushijima T. (2010) Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. Adv Genet, 71: 41-56.
- Nusse R, Clevers H. (2017) Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Cell, 169: 985-999.
- O'Brien MJ. (2007) Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. Gastroenterol Clin North Am, 36: 947-968.
- 88. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amorosino M, Farraye FA. (2006) Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. Am J Surg Pathol, 30: 1491-1501.
- 89. Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, Kim TS, Kim NK, Chung HC, An S. (2013) Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. J Mol Diagn, 15: 498-507.
- 90. Oh TJ, Oh HI, Seo YY, Jeong D, Kim C, Kang HW, Han YD, Chung HC, Kim NK, An S. (2017) Feasibility of quantifying *SDC2* methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer. Clin Epigenetics, 9: 126.

- 91. Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T, Ushijima T. (2006) Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. Int J Cancer, 119: 1338-1344.
- 92. Oono Y, Fu K, Nakamura H, Iriguchi Y, Yamamura A, Tomino Y, Oda J, Mizutani M, Takayanagi S, Kishi D, Shinohara T, Yamada K, Matumoto J, Imamura K. (2009) Progression of a sessile serrated adenoma to an early invasive cancer within 8 months. Dig Dis Sci, 54: 906-909.
- 93. Palmer BR, Marinus MG. (1994) The dam and dcm strains of Escherichia coli--a review. Gene, 143: 1-12.
- 94. Park SJ, Rashid A, Lee JH, Kim SG, Hamilton SR, Wu TT. (2003) Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. Am J Pathol, 162: 815-822.
- 95. Park SJ, Kim SM, Hong YS, Lee JL, Kim JE, Kim KP, Hong SM, Jin DH, Kim CW, Yoon YS, Park IJ, Lim SB, Yu CS, Kim JC, Kim TW. (2015) TFAP2E methylation status and prognosis of patients with radically resected colorectal cancer. Oncology, 88: 122-132.
- 96. Patai AV, Molnár B, Kalmár A, Schöller A, Tóth K, Tulassay Z. (2012) Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. Dig Dis. 2012; 30: 310-315.
- 97. Patai AV, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. (2013) Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. World J Gastroenterol, 19: 607-615.
- 98. Patai AV, Micsik T, Botár Z, Patai A, Sipos J, Ringelhan B, Molnár B, Tulassay Z. (2014) Prevalence of preneoplastic serrated polyps in Hungary. Z Gastroenterol, 52: A52.
- 99. Patai ÁV, Micsik T, Péter Z, Horváth R, Molnár B, Tulassay Z. (2014) A fogazott polypok jelentősége a vastagbélrák kialakulásában. Magy Belorv Arch, 67: 225-233.
- 100. Patai Á, Patai ÁV. (2017) A gyomor-, bélrendszer rákbetegségeinek megelőzési stratégiái. A vastag- és végbélbélrák megelőzhető! (könyvfejezet) Vas prevenció egészségfejlesztési füzetek I., 53-62.
- 101. Paun BC, Kukuruga D, Jin Z, Mori Y, Cheng Y, Duncan M, Stass SA, Montgomery E, Hutcheon D, Meltzer SJ. (2010) Relation between normal rectal methylation, smoking status, and the presence or absence of colorectal adenomas. Cancer, 116: 4495-4501.
- 102. Péterfia B, Kalmár A, Patai AV, Bodor A, Micsik T, Wichmann B, Egedi K, Hollósi P, Kovalszky I, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Construction of a multiplex mutation hot spot

PCR panel: the first step towards colorectal cancer genotyping on the GS Junior platform. J Cancer, 8: 162-173.

- 103. Popat S, Hubner R, Houlston RS. (2005) Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol, 23: 609-618.
- 104. Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. (2006) World J Gastroenterol, 12: 7113-7117.
- 105. Ramos MP, Wijetunga NA, McLellan AS, Suzuki M, Greally JM. (2015) DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. Epigenetics Chromatin, 8: 11.
- 106. R Core Team (2012). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Bécs, 2012. Elérhető: http://www.R-project.org. Elérve 2013.09.19.
- 107. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, Taylor G, Barrett JH, Quirke P. (2009) KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. J Clin Oncol, 27: 5931–5937.
- 108. Rubin JS, Barshishat-Kupper M, Feroze-Merzoug F, Xi ZF. (2006) Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. Front Biosci, 11: 2093-2105.
- 109. SEER adatbázis. Elérhető:
  - https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\_2013/browse\_csr.php?sectionSEL=1&pageSEL= sect\_01\_table.16.html. Elérve 2017.08.01.
- 110. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D. (2013) A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. Nat Med, 19: 619-625.
- 111. Sakai E, Fukuyo M, Ohata K, Matsusaka K, Doi N, Mano Y, Takane K, Abe H, Yagi K, Matsuhashi N, Fukushima J, Fukayama M, Akagi K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. (2016) Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. Int J Cancer, 138: 1634-1644.

- 112. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. (2007) Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. Carcinogenesis, 28: 2459-2466.
- 113. Scarpa M, Scarpa M, Castagliuolo I, Erroi F, Kotsafti A, Basato S, Brun P, D'Incà R, Rugge M, Angriman I, Castoro C. (2016) Aberrant gene methylation in non-neoplastic mucosa as a predictive marker of ulcerative colitis-associated CRC. Oncotarget, 7: 10322-10331.
- 114. Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. (2007) Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. PLoS Genet, 3: 1709–1723.
- 115. Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A, Perou CM, Kim YH, Pollack JR, Fong KM, Lam CL, Wong M, Shyr Y, Nanda R, Olopade OI, Gerald W, Euhus DM, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. (2006) A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. PLoS Med, 3: e486.
- 116. Shen JC, Rideout WM 3rd, Jones PA. (1994) The rate of hydrolytic deamination of 5methylcytosine in double-stranded DNA. Nucleic Acids Res, 22:972-976.
- 117. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP. (2005) MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst, 97: 1330-1338.
- 118. Sheridan TB, Fenton H, Lewin MR, Burkart AL, Iacobuzio-Donahue CA, Frankel WL, Montgomery E. (2006) Sessile serrated adenomas with low- and high-grade dysplasia and early carcinomas: an immunohistochemical study of serrated lesions "caught in the act". Am J Clin Pathol, 126: 564-571.
- 119. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. (2017) Colorectal cancer statistics, 2017. CA Cancer J Clin, 67: 177-193.
- 120. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J,

Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science, 314: 268-274.

- 121. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer, 6: 963-968.
- 122. Snover D, Ahnen D, Burt R, Odze RD. Serrated Polyps of the Colon and Rectum and Serrated Polyposis. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (szerk). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. IARC, Lyon, 2010: 160-165.
- 123. Snover DC. (2011) Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. Hum Pathol, 42: 1-10.
- 124. Strum WB. (2016) Colorectal adenomas. N Engl J Med, 374: 1065-1075.
- 125. Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, Ito K, Yeoh KG, Wong R, Guenther T, Will O, Chen CL, Kumarasinghe MP, Ito Y, Salto-Tellez M. (2009) RUNX3 inactivation in colorectal polyps arising through different pathways of colonic carcinogenesis. Am J Gastroenterol, 104: 426-436.
- 126. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijenberg MP, Herman JG, Baylin SB. (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. Nat Genet, 31: 141-149.
- 127. Tadepalli US, Feihel D, Miller KM, Itzkowitz SH, Freedman JS, Kornacki S, Cohen LB, Bamji ND, Bodian CA, Aisenberg J. (2011) A morphologic analysis of sessile serrated polyps observed during routine colonoscopy (with video). Gastrointest Endosc, 74: 1360-1368.
- 128. Taguchi YH, Iwadate M, Umeyama H. (2016) SFRP1 is a possible candidate for epigenetic therapy in non-small cell lung cancer. BMC Med Genomics, 12; Suppl 1: 28.
- 129. Tahara T, Hirata I, Nakano N, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Ohmiya N. (2017) Comprehensive DNA Methylation Profiling of Inflammatory Mucosa in Ulcerative Colitis. Inflamm Bowel Dis, 23: 165-173.
- 130. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Nosho K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. (2005) Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. Oncogene, 24: 7946-7952.

- 131. Tham C, Chew M, Soong R, Lim J, Ang M, Tang C, Zhao Y, Ong SY, Liu Y. (2014) Postoperative serum methylation levels of TAC1 and SEPT9 are independent predictors of recurrence and survival of patients with colorectal cancer. Cancer, 120: 3131-3141.
- 132. Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. (2017) A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer. Gastroenterology, 153: 1634-1646.e8.
- 133. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. (2003) Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. Am J Surg Pathol, 27: 65-81.
- 134. Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, Snover DC (2008) Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). Am J Surg Pathol, 32: 21-29.
- 135. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. (2016) Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends – An Update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 25: 16-27.
- 136. Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B.(2012) Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. PLoS One, 7: e46000.
- 137. Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) Detection of methylated Septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. PLoS One, 9: e115415.
- 138. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 8681-8686.
- 139. Ushijima T. (2007) Epigenetic field for cancerization. J Biochem Mol Biol, 40: 142-150.
- 140. van Vlodrop IJ, Niessen HE, Derks S, Baldewijns MM, van Criekinge W, Herman JG, van Engeland M. (2011) Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location. Clin Cancer Res, 17: 4225-4231.
- 141. Vecchi M, Nuciforo P, Romagnoli S, Confalonieri S, Pellegrini C, Serio G, Quarto M, Capra M, Roviaro GC, Contessini Avesani E, Corsi C, Coggi G, Di Fiore PP, Bosari S. (2007) Gene expression analysis of early and advanced gastric cancers. Oncogene, 26: 4284-4294.

- 142. Veganzones S, Maestro ML, Rafael S, de la Orden V, Vidaurreta M, Mediero B, Espantaleon M, Cerdan J, Diaz-Rubio E. (2015) Combined methylation of p16 and hMLH1 (CMETH2) discriminates a subpopulation with better prognosis in colorectal cancer patients with microsatellite instability tumors. Tumour Biol, 36: 3853-3861.
- 143. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med, 319: 525-532.
- 144. Wang Z, Yuan X, Jiao N, Zhu H, Zhang Y, Tong J. (2012) CDH13 and FLBN3 gene methylation are associated with poor prognosis in colorectal cancer. Pathol Oncol Res, 18: 263-270.
- 145. Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. (2001) Methylation of O-6methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. Cancer Res, 61: 827-830.
- 146. Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. (2004) Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. Gut, 53: 573-580.
- 147. Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, Midorikawa Y, Nishimura Y, Sakamoto H, Seto Y, Aburatani H, Kaneda A. (2010) Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clin Cancer Res, 16: 21-33.
- 148. Yi JM, Dhir M, Guzzetta AA, Iacobuzio-Donahue CA, Heo K, Yang KM, Suzuki H, Toyota M, Kim HM, Ahuja N. (2012) DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. Tumour Biol, 33: 363-372.
- 149. Zhang ZM, Wang Y, Huang R, Liu YP, Li X, Hu FL, Zhu L, Wang F, Cui BB, Dong XS, Zhao YS. (2014) TFAP2E hypermethylation was associated with survival advantage in patients with colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 140: 2119-2127.
- 150. Zhong X, Zhu Y, Mao J, Zhang J, Zheng S. (2013) Frequent epigenetic silencing of PCDH10 by methylation in human colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 139: 485-490.

# 12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 12.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

- Barták BK, Kalmár A, Péterfia B, Patai ÁV, Galamb O, Valcz G, Spisák S, Wichmann B, Nagy ZB, Tóth K, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2017) Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples. Epigenetics, 12: 751-763.
   IF: 4,394
- 2. Patai ÁV\* és Barták BK\* és Péterfia B\*, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, Péter Z, Patai Á, Valcz G, Kalmár A, Tóth K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Comprehensive DNA methylation and mutation analyses reveal a methylation signature in colorectal sessile serrated adenomas. Pathol Oncol Res, 23: 589-594. \*megosztott első szerzők

IF: 1,736

- Tóth K, Patai ÁV, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Galamb O, Wichmann B, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Circadian Rhythm of Methylated Septin 9, Cell-Free DNA Amount and Tumor Markers in Colorectal Cancer Patients. Pathol Oncol Res, 23: 699-706.
   IF: 1,736
- 4. Galamb O, Kalmár A, Péterfia B, Csabai I, Bodor A, Ribli D, Krenács T, Patai ÁV, Wichmann B, Barták BK, Tóth K, Valcz G, Spisák S, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. Epigenetics, 11: 588-602.
  IF: 4,394
- 5. Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Patai ÁV, Leiszter K, Péterfia B, Wichmann B, Valcz G, Veres G, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Aging related methylation influences the gene expression of key control genes in colorectal cancer and adenoma linked key control genes. World J Gastroenterol, 22: 10325-10340.

IF: 3,365

- 6. Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Bodor A, Tóth K, Patai ÁV, Valcz G, Nagy ZB, Kubák V, Tulassay Z, Kovalszky I, Molnár B. (2015) DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. BMC Cancer, 15: 736. IF: 3,265
- Kalmár A, Péterfia B, Wichmann B, Patai ÁV, Barták BK, Nagy ZB, Furi I, Tulassay Z, Molnár B. Comparison of automated and manual DNA isolation methods for DNA methylation analysis of biopsy, fresh frozen, and formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. J Lab Autom, 20: 642-651.
   IF: 1,297
- Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Wichmann B, Bodor A, Patai ÁV, Schöller A, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Bisulfite-based DNA methylation analysis from recent and archived formalin-fixed, paraffin embedded colorectal tissue samples. Pathol Oncol Res, 21: 1149-1156.
  - IF: 1,940
- 9. Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2015) Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. PLoS One, 10: e0118332.
  IF: 3,057
- 10. Patai ÁV, Valcz G, Hollósi P, Kalmár A, Péterfia B, Patai Á, Wichmann B, Spisák S, Barták BK, Leiszter K, Tóth K, Sipos F, Kovalszky I, Péter Z, Miheller P, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Comprehensive DNA methylation analysis reveals a common ten-gene methylation signature in colorectal adenomas and carcinomas. PLoS One, 10: e0133836.
  IF: 3,057

- 11. Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) Detection of methylated Septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. PLoS One, 9: e115415.
  IF: 3,234
- 12. Valcz G\* és Patai ÁV\*, Kalmár A, Péterfia B, Fűri I, Wichmann B, Műzes G, Sipos F, Krenács T, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z. (2014) Myofibroblast-derived SFRP1 as potential inhibitor of colorectal carcinoma field effect. PLoS One, 9: e106143.
  \*megosztott első szerzők
  IF: 3.234
- 13. Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. PLoS One, 7: e46000.
  IF: 3,730

#### 12.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

14. Péterfia B, Kalmár A, Patai ÁV, Bodor A, Micsik T, Wichmann B, Egedi K, Hollósi P, Kovalszky I, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Construction of a multiplex mutation hot spot PCR panel: the first step towards colorectal cancer genotyping on the GS Junior platform. J Cancer, 8: 162-173.

#### IF: 2,916

- 15. Valcz G, Galamb O, Krenács T, Spisák S, Kalmár A, Patai ÁV, Wichmann B, Dede K, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. Mod Pathol, 29: 928-938.
  IF: 5,728
- 16. Patai Á, Solymosi N, Patai ÁV. (2015) Effect of rectal indomethacin for preventing post-ERCP pancreatitis depends on difficulties of cannulation: results from a randomized study with sequential biliary intubation. J Clin Gastro, 49: 429-437.

#### IF: 3,163

17. Patai Á, Solymosi N, Patai ÁV. (2014) Does rectal indomethacin given for prevention of post-ERCP pancreatitis increase bleeding after biliary endoscopic sphincterotomy or cardiovascular mortality. Post hoc analysis using prospective clinical data. Medicine, 93: e159.

IF: 5,723

18. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai AV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2013) Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. PLoS One, 8: e74140.

IF: 3,534

19. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z. (2012) Increase of α-SMA(+) and CK(+) cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. Pathol Oncol Res, 18: 371-376.

IF: 1,555

- 20. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2011) Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow derived cells in colonic mucosa. J Clin Pathol, 64: 771-775.
  IF: 2,306
- 21. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. Pathol Oncol Res, 16: 541-545. IF: 1,483

## 13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

- Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik doktori munkám során szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:
- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, aki munkám során végig segített és támogatott;
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy egy korszerűen felszerelt laboratóriumban dolgozhattam, irányítása alatt a tudományos kutatópályámon elindulhattam, segítségével számos hazai és külföldi konferencián mélyíthettem tudásomat és mutathattam be közös kutatásaink eredményeit. Motiváló személyisége, olyankor mérhetetlen türelme, az új és ismeretlen iránti állandó kíváncsisága laboratóriumában pezsgő és innovatív tudományos légkört teremtett, ahol számos barátra is szert tehettem;
- Dr. Valcz Gábornak, Barátomnak, aki kutatói pályám kezdetétől támogatott, a cikkírás fortélyaira megtanított, az immunhisztokémiai vizsgálatokat kielemezte, dolgozatomat alaposan és értő módon átnézte, javította;
- Dr. Kalmár Alexandrának, akihez mindig fordulhattam kérdéseimmel, bármilyen problémámmal, példamutató precizitásával sokszor javította közleményeim és dolgozatom színvonalát;
- Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Hollósi Péternek és Prof. Dr. Kovalszky Ilonának a mutációs vizsgálatokban nyújtott segítségért;
- Dr. Fűri Istvánnak és Csorba Gézáné Maricának† a sejtkísérletek elvégzéséért;
- Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért;
- Kónyáné Farkas Gabriellának az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséért;
- Tóth Bernadett és Nagy Anita asszisztenseknek a mintagyűjtésben nyújtott segítségéért;
- Dr. Butz Henriett és Dr. Hagymási Krisztina házi opponenseimnek alapos minden részletre kiterjedő bírálatukért;
- Dr. Tóth Kingának, Dr. Leiszter Katalinnak, Dr. Krenács Tibornak, Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának, Dr. Spisák Sándornak, Dr. Sipos Ferencnek, Barták Barbara Kingának, Nagy Zsófia Brigittának és Dr. Schöller Andreának laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért és barátságukért;

- Berczik Máriának barátságáért, és számos adminisztratív feladat megoldásában nyújtott segítségéért;
- Nagy Ádám TDK hallgatómnak az ábrák szerkesztéséhez nyújtott segítségéért;
- a Semmelweis Egyetem II. sz Belgyógyászati Klinika valamennyi igazgatójának (Prof. Dr. Rácz Károlynak<sup>†</sup>, Prof. Dr. Tóth Miklósnak, Prof. Dr. Igaz Péternek), dolgozójának, különösen a Gasztroenterológiai Osztály és az Endoszkópos Laboratórium orvosainak, asszisztenseinek és nővéreinek, és kiemelten a Klinika fiatal orvosainak, barátaimnak, akik munkám során támogató légkört teremtettek;
- a Soproni Erzsébet Kórház Endoszkópos Laboratóriumának orvosainak és asszisztenseinek a mintagyűjtésben nyújtott segítségért;
- végül, de egyáltalán nem utolsó sorban türelmükért Barátaimnak és Családomnak, különösen pedig Édesapámnak, akinek önzetlen segítsége és támogatása számos alkalommal lendítette előre munkámat a nehéz pillanatokban.

# 14. FÜGGELÉK

1. táblázat: A vastag- és végbélrák stádiumbeosztásainak összehasonlítása. (MAC: módosított Astler-Coller beosztás)

Stádium	Т	Ν	М	Dukes	MAC
0	Tis	NO	M0	-	-
Ι	T1	NO	M0	А	А
	T2	NO	M0	А	B1
II A	Т3	NO	M0	В	B2
II B	T4a	NO	M0	В	B2
II C	T4b	NO	M0	В	B3
III A	T1-2	N1/N1c	M0	С	C1
	T1	N2a	M0	С	C1
III B	T3-T4a	N1/N1c	M0	С	C2
	T2-T3	N2a	M0	С	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	С	C1
III C	T4a	N2a	M0	С	C2
	T3-T4a	N2b	M0	С	C2
	T4b	N1-N2	M0	С	C3
IV A	Bármelyik T	Bármelyik N	M1a	-	-
IV B	Bármelyik T	Bármelyik N	M1b	-	-

Primer tumor (T)	
Тх	Primer tumor nem értékelhető
ТО	Primer tumor nem igazolható
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialis vagy a lamina propria
	inváziója
T1	Submucosára terjedő tumor
T2	Muscularis propriára terjedő tumor
T3	Muscularis proprián keresztül a pericolorectalis szövetekbe törő
	tumor
T4a	Visceralis peritoneum felszínére penetráló tumor
T4b	Környező szervekbe törő tumor
Regionális nyirokcsomók	
(N)	
Nx	Reginonális nyirokcsomók nem értékelhetőek
NO	Nincs nyirokcsomóáttét
N1	Áttét 1-3 nyirokcsomóban
N1a	Áttét csak 1 nyirokcsomóban
N1b	Áttét 2-3 nyirokcsomóban
N1c	Tumorszigetek a subserosán, a mesenteriumban vagy
	hashártyával nem borított pericolicus vagy perirectalis

	szövetekben nyirokcsomó áttét nélkül		
N2	Áttét 4 vagy több nyirokcsomóban		
N2a	Áttét 4-6 nyirokcsomóban		
N2b	Áttét 7 vagy több nyirokcsomóban		
Távoli áttét			
M0	Nincs távoli áttét		
M1	Távoli áttét		
M1a	Távoli áttét egy szervben vagy nem regionális nyirokcsomóban		
M1b	Távoli áttét több szervben vagy a peritoneumon		

Minta		Kor	Elhelyezkedés	
Gyermek ép (young – Y)				
Y1	F	1	colon	
Y2	Ν	3	colon	
Y3	F	6	colon	
Y4	Ν	9	colon	
Y5	F	17	rectum	
Felnőtt ép (normal healthy adult – N)				
N1	N	71	descendens	
N2	F	41	rectum	
N3	F	74	sigma	
N4	F	32	rectum	
N5	N	65	sigma	
CRC-től <2 cm-re (field – F)				
F1	N	76	rectum	
F2	N	68	sigma	
F3	F	58	sigma	
F4	F	60	rectum	
CRC-től >10 cm-re (cancer normal – CN)				
CN1	N	76	rectum	
CN2	Ν	68	sigma	
CN3	F	58	sigma	
CN4	F	60	rectum	
Colitis ulcerosa, aktív stádium (UCa)				
UCa1	F	37	rectum	
UCa2	N	37	rectum	
UCa3	Ν	42	sigma	
UCa4	F	69	rectum	
Colitis ulcerosa, inaktív stádium (UCi)				
UCi1	N	35	sigma	
UCi2	N	45	sigma	
UCi3	F	43	rectum	
UCi4	F	61	sigma	
Tubularis adenoma low-grade diszpláziával (LGD)				
LGD1	Ν	54	sigma	
LGD2	Ν	63	rectum	
LGD3	F	65	rectum	
LGD4	F	66	sigma	
LGD5	F	79	sigma	
LGD6	N	70	rectum	
LGD7	F	55	sigma	
LGD8	N	69	rectum	
LGD9	F	69	sigma	

# 2. táblázat: Nem daganatos minták demográfiai jellemzői

LGD10	F	84	coecum	
LGD11	F	69	rectum	
LGD12	Ν	60	rectum	
LGD13	F	55	sigma	
LGD14	Ν	60	sigma	
LGD15	Ν	78	sigma	
LGD16	Ν	57	rectum	
LGD17	Ν	68	sigma	
Adenoma high-grade diszpláziával (HGD)				
HGD1	Ν	77	sigma	
HGD2	Ν	77	sigma	
HGD3	Ν	60	rectum	
HGD4	F	61	sigma	
HGD5	F	72	rectum	
HGD6	F	74	rectum	
Fogazott adenoma (SSA, TSA)				
SSA1	F	59	sigma	
SSA2	Ν	56	transversum	
SSA3	F	82	ascendens	
SSA4	F	78	ascendens	
TSA	F	48	transversum	

Minta	Nem	Kor	Elhelyezkedés	Stádium
Vastag- és végbélrák, I-III. stádium (CRC)				
CRC1	F	76	rectum	II
CRC2	Ν	56	sigma	Ι
CRC3	F	66	rectum	Ι
CRC4	Ν	70	rectum	Ι
CRC5	F	55	sigma	III
CRC6	Ν	69	rectum	III
CRC7	F	69	sigma	III
CRC8	F	55	sigma	Ι
CRC9	Ν	60	hepatica	III
CRC10	Ν	78	sigma	Ι
CRC11	Ν	57	rectum	II
CRC12	F	84	coecum	Ι
CRC13	Ν	76	rectum	II
CRC14	Ν	68	sigma	II
CRC15	F	58	sigma	II
CRC16	F	60	rectum	II
CRC17	Ν	70	rectum	III
Vastag- és végbélrák, IV. stádium (MCRC)				
MCRC1	F	46	sigma	IV
MCRC2	Ν	72	rectum	IV
MCRC3	F	68	rectum	IV
MCRC4	Ν	66	sigma	IV
MCRC5	F	68	sigma	IV
MCRC6	Ν	60	sigma	IV
MCRC7	F	84	coecum	IV

3. táblázat: Daganatos minták demográfiai jellemzői