

A vastagbél-daganatok kialakulásában szerepet játszó DNS metilációs eltérések vizsgálata a sejten kívüli DNS frakcióban

Doktori értekezés

Molnár Barbara Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Peták István, Ph.D., tudományos igazgató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára, Ph.D. habil. egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos
főmunkatárs
Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető
főorvos

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
2. BEVEZETÉS	9
2.1. Vastagbél-daganatok jelentősége.....	9
2.1.1. Epidemiológiai háttér	9
2.1.2. A vastagbélrák kialakulásának molekuláris alapjai	10
2.1.3. A vastagbélrák patológiája	15
2.1.4. A vastagbélrák diagnosztikai és szűrőmódszerei.....	17
2.2. A sejten kívüli szabad DNS jellemzése	20
2.2.1. A szabad DNS felfedezése.....	20
2.2.2. A szabad DNS eredete.....	21
2.2.3. A szabad kDNS mennyiségi és minőségi jellemzői.....	22
2.3. A vastagbélrák molekuláris markerei	23
2.3.1. Genetikai markerek	24
2.3.2. Epigenetikai markerek.....	25
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	34
4. MÓDSZEREK.....	35
4.1. Betegek és minták.....	35
4.2. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával	36
4.2.1. Sejten kívüli DNS felszabadulásának elemzése	36
4.2.2. Sejten kívüli DNS degradációjának vizsgálata.....	41
4.3. Az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban	46
4.3.1. Mintagyűjtés	46
4.3.2. A DNS metilációt mutató gének kiválasztása.....	47
4.3.3. Makrodisszekció	48
4.3.4. Biszulfid konverzió	48
4.3.5. Biszulfid-specifikus polimeráz lánreakció	48
4.3.6. Piroszekvenálás 454 GS Junior készülékkel.....	49
4.3.7. Methyl capture szekvenálási adatok <i>in silico</i> vizsgálata	50
4.3.8. Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip adatok <i>in silico</i> elemzése	50
4.3.9. Immunhisztokémiai elemzések.....	51

4.3.10. DNS izolálás vastagbél biopszia és plazmamintákból	51
4.3.11. Biszulfid konverzió	52
4.3.12. Multiplex biszulfid-specifikus preamplifikáció	52
4.3.13. MethyLight polimeráz láncreakció	55
4.3.14. Alkalmazott statisztikai módszerek.....	55
4.4. Különböző DNS izolálási módszerek hatásának elemzése a DNS metilációs mintázatra.....	56
4.4.1. Betegek és minták	56
4.4.2. Szabad DNS izolálási és biszulfid-konverziós módszerek.....	57
4.4.3. Multiplex preamplifikáció és MethyLight PCR	58
4.4.4. Statisztikai elemzések.....	59
4.5. A Septin 9 gén metilációjának összevetése az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének metilációs szintjével	59
4.5.1. Betegek és minták	59
4.5.2. DNS izolálás és biszulfid konverzió	60
4.5.3. Kvantitatív PCR	60
4.5.4. Statisztikai értékelés	61
5. EREDMÉNYEK.....	62
5.1. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával	62
5.1.1. A szabad DNS felszabadulásának elemzése.....	62
5.1.2. A sejten kívüli DNS lebomlásának vizsgálata.....	65
5.2. Az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban	69
5.2.1. Piroszekvenálási adatok kiértékelése	69
5.2.2. A DNS metilációs mintázat <i>in silico</i> vizsgálata Methyl capture szekvenálási adatok alapján.....	70
5.2.3. Illumina Infinium metilációs adatok <i>in silico</i> elemzése a vizsgált 4 marker teljes promóter szakaszain.....	72
5.2.4. Az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének promóter metilációjának hatása a fehérje expresszióra.....	74
5.2.5. A 4 marker DNS metilációs mintázata párosított szövet- és plazmamintákban	77
5.2.6. A sejten kívüli szabad DNS (skDNS) mennyisége	79
5.2.7. Az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének promóter metilációjának gyakorisága és mértéke plazmamintákban.....	80

5.3. Különböző skDNS izolálási módszerek hatásának elemzése a metilációs mintázatra.....	85
5.3.1. A High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (HP) és az Epi proColon 2.0 (EpC) kézi izoláló kitek összevetése.....	85
5.3.2. A High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit kézi és InviGenius automata skDNS izolálási módszerek összehasonlítása	85
5.3.3. A manuális Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit (QcD, Zymo) és az InviGenius PLUS automata skDNS izolálási módszer összevetése	89
5.3.4. Vértvételi gyűjtőcsövek összehasonlítása: K3EDTA vs. Cell-Free DNA BCT®.....	91
5.4. A Septin 9 gén metilációjának összevetése az <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SDC2</i> és <i>PRIMA1</i> gének metilációs szintjével	92
5.4.1. A szabad DNS mennyisége	93
5.4.2. Septin 9 pozitivitás	93
6. MEGBESZÉLÉS	95
6.1. A szabad DNS felszabadulásának és stabilitásának vizsgálata.....	96
6.2. Metilációs markerek vizsgálata humán szövet- és plazmamintákban	100
6.3. A szabad DNS izolálási módszerek hatása a DNS metilációs vizsgálatokra.....	107
6.4. A metilációs panel hatékonyságának összevetése egyéb nem invazív módszerekkel	110
6.5. Legfontosabb új megállapítások.....	114
7. KÖVETKEZTETÉSEK	116
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	117
8.1. Magyar összefoglaló.....	117
8.2. Angol összefoglaló	118
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	119
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	143
10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények	143
10.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények	144
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	146

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AChE – Acetilcolin-észteráz (Acetylcholinesterase)

ACTB – β -aktin (Actin Beta)

ADAMTS5 – Disintegrin és metalloproteináz trombospondinnal, I. típus, 5. motívum (Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 5)

ADHFE1 – Alkohol dehidrogenáz vas tartalommal 1 (Alcohol Dehydrogenase Iron Containing 1)

AJCC – Amerikai Rákos Betegségeket Vizsgáló Albizottság (American Joint Committee on Cancer)

ALX4 – ALX Homeobox 4

APBA1/MINT1 – Amiloid béta prekursor fehérje-kötő család 1. tag (Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 1)

APC – Adenomatosis polyposis coli

BCL2 – B-sejt CLL/Limfóma 2 (Apoptosis regulator B-Cell CLL/Lymphoma 2)

BCP – 1-bróm-3-klórpropán

BMP3 – Csont morfogenetikus fehérje 3 (Bone Morphogenetic Protein 3)

BOLL – Boule homológ, RNS-kötő fehérje (Boule Homolog, RNA Binding Protein)

BRAF – B-Raf proto-onkogén

BSP – Biszulfid-specifikus PCR

CA19-9 – Rák antigén 19-9 (Cancer Antigen 19-9)

CAT – Kloramfenikol acetyl transzferáz

CDH1 – Kadherin 1

CDH13 – Kadherin 13

CDKN2A/p16 – Ciklin-függő kináz inhibitor 2A

CEA – Carcino-embriónális antigén

CHARM – Nagy áteresztőképességű módszer a relatív metiláció megállapítására (Comprehensive High-throughput Arrays for Relative Methylation)

CIMP – CpG-sziget metilátor fenotípus

CIN – Kromoszóma instabilitás

COL1A2 – I. típusú kollagén alfa 2

CpG – Citozin-guanin dinukleotid

CpG-sziget – CG dinukleotidban gazdag szekvencia régió

CRBP1 – Celluláris retinol kötő fehérje 1 (Cellular Retinol Binding Protein 1)

CRC – Vastagbélrák (Colorectal cancer)
CTC – Computer tomográf colonográfia
CXCL12 – C-X-C motívum kemokin ligand 12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12)
CYFRA 21-1 – Citokeratin 19 fragmentum
DAPK1 – Halál-asszociált protein kináz (Death associated protein kinase 1)
DCC – Vastagbélrákban deletált gén (Deleted In Colorectal Carcinoma)
DMR – Eltérően metilált régiók (Differentially methylated region)
DNMT – DNS-metiltranszferáz
DNS – Dezoxiribonukleinsav
E-cad – E-kadherin
EDTA – Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR – Epidermális növekedési faktor receptor
ERV – Endogén retrovírus
ESR1 – Ösztrogén receptor 1
EYA4 – EYA transzkripcionális koaktivátor és foszfatáz 4 (EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4)
FAM – 6-fluoreszcein amidit jelölés
FAP – Familiáris adenomatosus polyposis
FBN1 – Fibrillin 1
FFPE – Formalin-fixált paraffinba-ágyazott
FHIT – Fragilis hisztidin triád (Fragile histidine triad)
FIT – Immunalapú széklet vértartalom meghatározás (Fecal Immunochemical Test)
FRET – Fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer
GAPDH – Gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GAS7 – Növekedést gátló gén 7 (Growth arrest specific 7)
GATA5 – GATA-kötő fehérje 5 (GATA Binding Protein 5)
GEO – Gén expressziós adatbázis (Gene Expression Omnibus)
gFOBT – Guajak alapú széklet occult vérvizsgálat (Fecal occult blood test)
GSK3 β – Glikogén-szintáz-kináz-3 β
HE – Hematoxin-eozin festés
HLTF – Helikáz-szerű transzkripció faktor (Helicase like transcription factor)
hnkRNS – Hosszú, nem kódoló RNS
HNPPC – Herediter nonpolipózis vastagbélrák
HP – Hiperplasztikus adenóma

HPP1 – Hiperpigmentáció progresszív 1 (Hyperpigmentation, progressive, 1)
ID4 – DNS-kötő inhibitor 4 (Inhibitor of DNA binding 4)
IL6 – Interleukin 6
IRF8 – Interferon szabályozó faktor 8 (Interferon regulatory factor 8)
ITGA4 – Integrin alfa 4 alegység (Integrin subunit alpha 4)
K-ras – Kirsten rat sarcoma gén
LAMA1 – Laminin alfa 1 alegység (Laminin subunit alpha 1)
LOH – Heterozigotitás elvesztése (Loss of heterozygosity)
LPS – Lipopoliszacharid
MAEL – Maelstrom spermatogén transzpozon csendesítő (Maelstrom spermatogenic transposon silencer)
MAPK – Mitogén-aktivált protein kináz (ERK)
MeCP2 – Metil-CpG kötő fehérje
MeDIP – Metilált-DNS Immunprecipitáció
MEK – MAPK/ERK kináz
MetCap – Methyl capture szekvenálás
MGB – Kis-árok kötő jelölés (Minor groove binder)
MGMT – O-6-metilguanin-DNS metiltranszferáz
MII – Metasztázis inhibíciós index
miRNS – mikroRNS
MLH1 – MutL Homológ 1
MLP – MethyLight primerek
ML-PCR – MethyLight PCR
MMR – DNS hibajavító rendszer (Mismatch repair)
MSH2 – MutS Homológ 2
MS-HRM – Metilációs-specifikus nagy felbontású olvadáspont analízis
MSI – Mikroszatellita instabilitás
MSI-H – Magas szintű mikroszatellita instabilitás
MSI-L – Alacsony szintű mikroszatellita instabilitás
MSP – Metiláció-specifikus PCR
MSS – Mikroszatellita stabilitás
NAT – Tumor melletti ép szövet (Normal adjacent tissue)
NET – Extracelluláris neutrophil csapda (Neutrophil extracellular trap)
NGFR – Neuronális növekedési faktor receptor (Nerve Growth Factor Receptor)

NPTX2 – Neuronális pentraxin 2 (Neuronal Pentraxin 2)
NPY – Neuropeptid Y
O⁶-MGMT – O⁶-metilguanin-metiltranszferáz
OSMR – Onkostatin M receptor
PBS – Foszfát-pufferes sóoldat (Phosphate buffered saline)
PCR – Polimeráz-lánreakció (Polymerase chain reaction)
PHA – Polihidroxialkanoát
PPi – Pirofoszfát
PRIMA1 – Prolin-gazdag membrán horgony 1 (Proline Rich Membrane Anchor 1)
PSAT1 – Foszfoserin aminosztransferáz 1 (Phosphoserine Aminotransferase 1)
PTGDR – Prostaglandin D2 receptor
RARβ – Retinsav receptor beta (Retinoic Acid Receptor Beta)
RASSF1A – Ras-asszociált domén család 1 tag (Ras Association Domain Family Member 1)
RNS – Ribonukleinsav
ROC – Vevő működési karakterisztika analízis (Receiver Operating Characteristic)
RRBS – Csökkentett reprezentációs biszulfid szekvenálás (Reduced-representation bisulfite sequencing)
RUNX3 – Runt-rokon transzkripciós faktor 3 (Runt Related Transcription Factor 3)
SAM – S-adenozil-metionin
SDC2 – Szindekán 2
SDS – Nátrium dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
SEPT9 – Septin 9
SFRP1 – Szekretált frizzled-rokon fehérje 1 (Secreted Frizzled Related Protein 21)
SFRP2 – Szekretált frizzled-rokon fehérje 2 (Secreted Frizzled Related Protein 2)
SFT2D3 – SFT2 domén 3 (SFT2 Domain Containing 3)
SHO – Immundeficiens szórtelen egértörzs (SCID Hairless Outbred)
SHOX2 – Rövid-termet homeobox 2 (Short Stature Homeobox 2)
skDNS – Sejten kívüli DNS
SLC5M8 – Oldott hordozó 5. család 8. tag (Solute Carrier Family 5 Member 8)
SLE – Szisztémás lupus erythematosus
SMAD4 – SMAD család 4. tag (SMAD Family Member 4)
SOCS3 – Citozin szignalizáció gátló 3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3)

SPARC – Savas és ciszteinben-gazdag szekretált fehérje (Secreted Protein Acidic and Rich In Cysteine)

TAQ – TaqMan próba

TCGA – Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas)

TET – Ten-eleven transzlokációs enzim

TFPI2 – Szöveti faktor útvonal gátló 2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2)

TGF β RII – Transzformáló növekedési faktor β receptor II (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2)

TIMP3 – Metalloproteináz 3 szöveti inhibitora (Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 3)

TLR – Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)

TMEFF2 – Transzmembrán fehérje 2 EGF-szerű és follistatin 2-szerű doménnal (Transmembrane Protein With EGF Like And Two Follistatin Like Domains 2)

TNF α – Tumor nekrozis faktor α (Tumor Necrosis Factor α)

TNM – Daganat stádium beosztás

TP53 – Tumor protein 53 (p53)

TWIST1 – Twist-család transzkripciós faktor 1 (Twist Family BHLH Transcription Factor 1)

UICC – Nemzetközi Rákellenes Unio (Unio Internationalis contra Cancrum)

VIC – 4,7,2-trikloro-7-fenil-6-karboxifluorescein

VIM – Vimentin

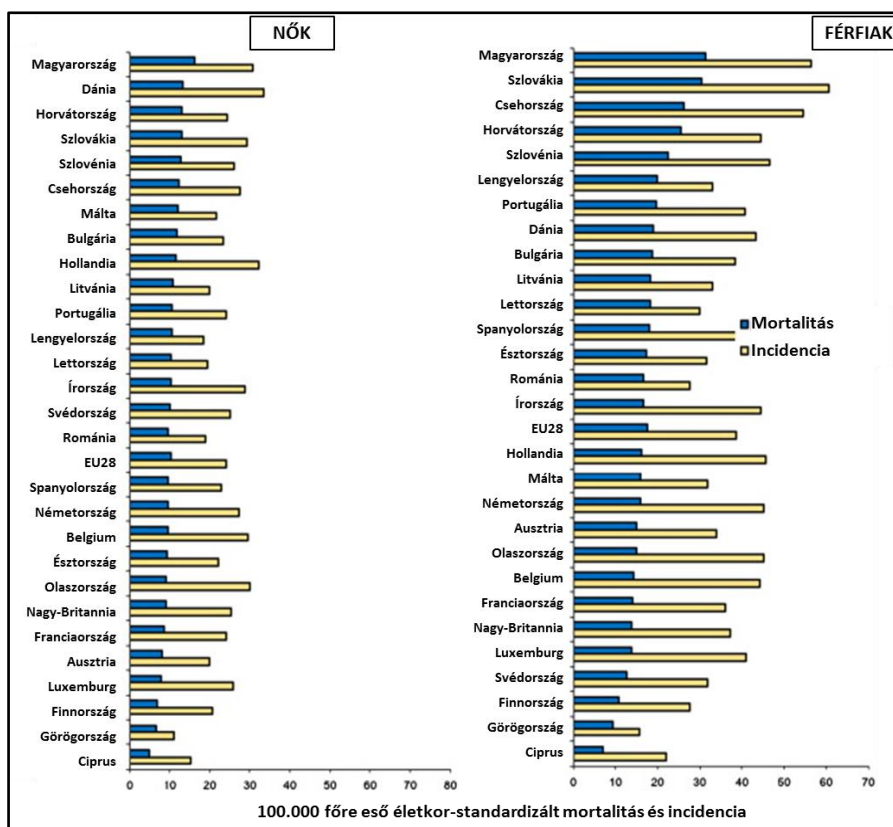
2. BEVEZETÉS

2.1. Vastagbél-daganatok jelentősége

2.1.1. Epidemiológiai háttér

A daganatos megbetegedések a leggyakoribb halált okozó betegségek közé tartoznak világszerte. Becslések szerint 2012-ben Európában 3,45 millió új diagnosztizált eset és 1,75 millió elhalálozás köthető valamely daganattípushoz [1]. A vastagbélrák (CRC) gyakoriság tekintetében a második helyen áll az emlődaganatok után (464.000 eset/év), az európai lakosságban évente 447.000 újonnan felfedezett esettel. A CRC a mortalitás szempontjából nézve is a második helyet foglalja el a tüdő tumorokat követve [2]. A vastagbélrák előfordulásában földrajzi különbségeket figyelhetünk meg, a betegség több, mint 63%-a ugyanis a fejlett országokban jelentkezik. Az Amerikai Egyesült Államokban, Ausztráliában, Új-Zélandon és Nyugat-Európában 100.000 emberből több, mint 40 szenved CRC-ben, míg Afrikában és Ázsia egyes részein ez a szám kevesebb, mint 5 fő [1].

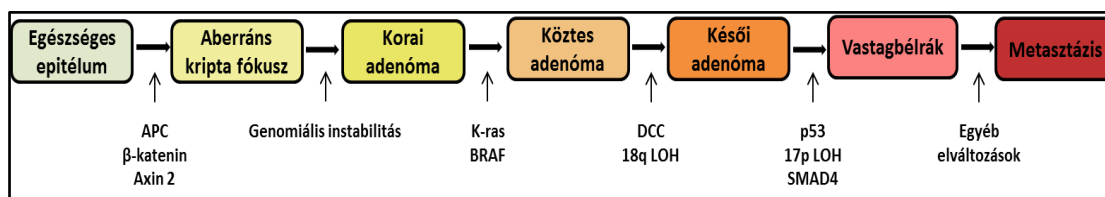
A CRC előfordulása férfiaknál gyakoribb, mint a nőknél, és kimagaslóan magas incidenciát mutat a közép-európai országokban [3], Magyarországot is beleértve (100.000 főre vetítve 87 férfi és 45 nő) (1. ábra). Hazánkban a betegek életkora a diagnózis időpontjában megközelítőleg 60 év. A vastagbélrák előfordulási aránya és mortalitása is egyre növekszik, az évente újonnan regisztrált betegek száma 9000 körül mozog, és a CRC mintegy 6000 halálesetet okoz [4, 5].



1. ábra. A vastagbél-daganatok incidenciája és mortalitása nők (bal) és férfiak (jobb) esetén 2013. évi európai felmérés alapján. Az ábra Altobelli és mtsai. (2014) alapján módosítva készült [3].

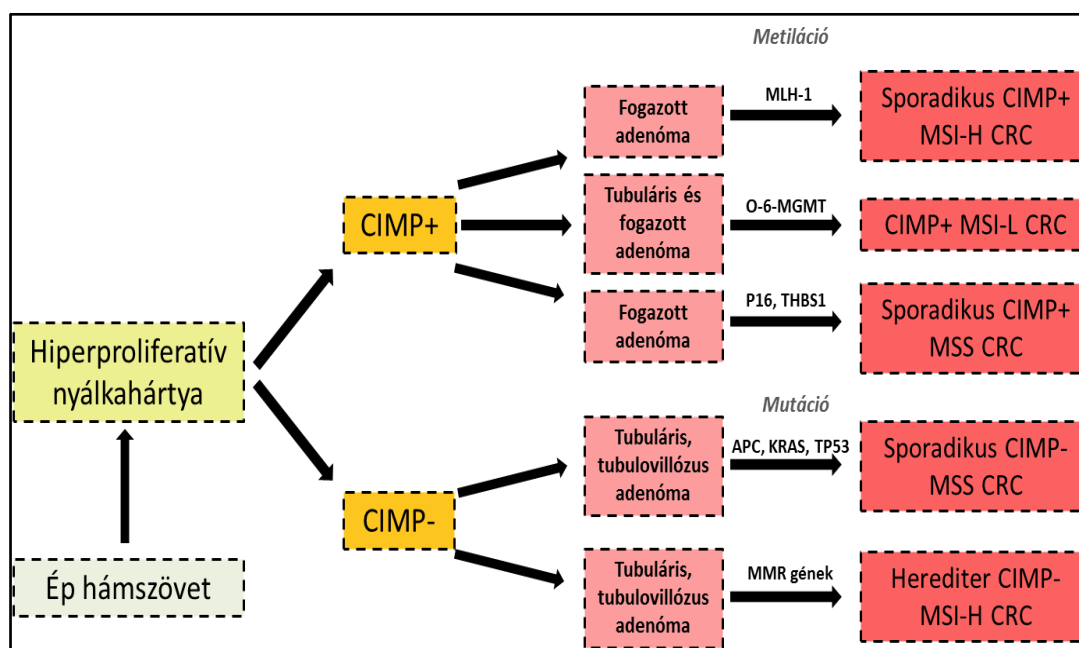
2.1.2. A vastagbélrák kialakulásának molekuláris alapjai

A vastagbélrák kialakulását az egészséges vastagbél nyálkahártya sejtjeiben bekövetkező, karcinogének okozta, vagy örökletes genetikai és epigenetikai változások indukálják. A klasszikus, Fearon és Vogelstein által leírt modell szerint az egészséges hámból korai, majd késői adenóma állapotokon keresztül keletkezik a vastagbélrák, amely elsősorban tumorszuppresszor gének inaktivációja és onkogének aktivációja révén valósul meg (2. ábra) [6].



2. ábra. Klasszikus Vogelstein-modell. Az ábra Morán és mtsai. (2010) alapján módosítva készült [7].

A CRC azonban a klasszikus adenóma – karcinóma szekvencia mellett más útvonalon is kialakulhat. Az ún. fogazott (serrated) útvonal jellemzője, hogy a tumor nem tubuláris és tubulovillózus adenómákból formálódik, hanem fogazott polipokból, aminek a következő altípusait különböztetjük meg: hiperplasztikus polip, szesszilis fogazott adenóma és tradicionális fogazott adenóma [8]. Erre az útvonalra jellemző a DNS hibajavító gének hibája, ami főleg a promótereik hipermetilációjának köszönhető, és mikroszatellita instabilitást okoz [9]. A vastagbél daganatok kialakulásának egyik kulcsfontosságú lépése a genomiális instabilitás, amely genetikai és epigenetikai módosulásokon keresztül valósulhat meg. A fentiek alapján két nagy daganatcsoportot, a kromoszóma instabilitást (CIN) és a mikroszatellita instabilitást (MSI) mutató daganatokat, illetve a DNS hipermetiláció következtében kialakult ún. CpG-sziget metilátor fenotípusú (CIMP) daganatokat különböztetjük meg [10]. A vastagbélrák kialakulásának legfontosabb útvonalait a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra. A vastagbélrák kialakulásának legfontosabb modelljei. Az ábra Haydon és mtsai. (2002) [11] és Remo és mtsai. (2012) [10] alapján módosítva készült. Rövidítések: CIMP – CpG-sziget metilátor fenotípus; MSI – mikroszatellita instabilitás; MSS – mikroszatellita stabilitás; CRC – vastagbélrák.

2.1.2.1. Genetikai instabilitás – CIN, MSI

Kromoszóma instabilitásról akkor beszélhetünk, ha a sejtek az egészségestől eltérő kromoszómakészlettel rendelkeznek (aneuploidia), ami jelentheti egy génszakasz egyik

alléljának elvesztését (loss of heterozygosity, LOH), vagy megsokszorozott kromoszóma szerelvényt (poliploidia) is. A fenti folyamatok bizonyos gének csökkent vagy fokozott expresszióját is okozhatják [12].

A mikroszatelliták bázis-ismétlődésekből álló rövid DNS-szakaszok, amelyek a genomban elszórtan helyezkednek el [13]. Jellemzően citozin és adenin ismétlődésekből állnak, hosszuk veleszületetten állandó, és egyéni különbségeket mutat. MSI esetében a mikroszatelliták száma és hossza replikációs hiba következtében megnövekszik vagy lecsökken. MSI akkor alakulhat ki, ha a DNS hibajavító rendszer (mismatch repair, MMR) génei helytelenül működnek, és ezáltal nem javítják ki a DNS replikáció vagy rekombináció során létrejövő inszerciókat, deléciókat vagy hibás bázisokat. A mikroszatellita státusz szerint három csoportot különböztetünk meg: mikroszatellita stabil (MSS), alacsony szintű instabilitást (MSI-L) és magas szintű instabilitást (MSI-H) mutató daganatokat. A mikroszatellita státusz meghatározásához két mononukleotid (BAT25 és BAT26) és három dinukleotid (D5S346, D2S123 és D17S250) markert vizsgálnak. MSI-L esetében a vizsgált lókuszek kevesebb, mint 40%-a mutat instabilitást, MSI-H esetében pedig a mikroszatellita lókuszek több, mint 40%-a. MSS tumorról akkor beszélünk, ha egyik lókuszt sem jelez instabilitást [14].

2.1.2.1.1. *MSS fenotípusú vastagbélrák*

A CRC 65-70%-a tartozik az MSS-típusú daganatok közé, amelyek létrejötté többnyire követi a klasszikus Vogelstein-modellt. Nagyrészt a bal colonsfélben jelennek meg 65 éves kor felett, jól differenciáltak, ritkán mucinózusak, limfocita infiltráció nem jellemző rájuk, gyakran jelenik meg kromoszóma instabilitás, és rossz prognózisúak [14]. A tumor kialakulásának egyik kezdeti lépése az adenomatosis polyposis coli (APC) gén mutációja, amely elváltozás a sporadikus CRC 75-80%-ában megtalálható [15]. A gén az 5q21 kromoszóma régióban található, és mutációk a génen belül számos helyen előfordulhatnak, amik elsősorban csonkolt fehérje szintéziséhez vezetnek [16]. Az APC gén által kódolt fehérje egészséges sejtekben a Wnt jelátviteli útvonal negatív regulátoraként működik. Az APC fehérje a glikogén-szintáz-kináz-3 β -val (*GSK3 β*), az axinnal és a β -kateninnel képes fehérjekomplexet képezni, amelynek köszönhetően a β -katenin degradálódik. Ha azonban az APC nem megfelelően működik, a β -katenin felszaporodik a citoplazmában, majd a sejtmagba bejutva különböző gének transzkripcióját idézi elő, amelyek sejtproliferációt, angiogenezist, apoptózis gátlást

vagy áttétképzést indukálnak [17-19]. Az *APC* gén csírasedes mutációja a familiáris adenomatous polyposis (FAP) szindrómát okozza, amelyre jellemző, hogy már fiatal felnőttkorban több száz, főleg 1 cm-nél kisebb polip alakul ki az érintett betegekben [20].

A *K-ras* onkogén 12. és 13. kodonját érintő mutációkat a tumorer 40-50%-ában lehet megtalálni, rendszerint már korai rákmegelőző állapotokban is. Az általa kódolt fehérje a kis *G*-típusú fehérjék családjába tartozik, *GTPáz* aktivitással rendelkezik, és a sejtproliferáció és a differenciáció szabályozásában játszik fontos szerepet. A gén mutációja következtében a fehérje konstitutívan aktív válik, ezáltal olyan jelátviteli folyamatok kapcsolnak be, amelyek a daganatok progressziójához vezetnek [21, 22].

A 18. kromoszómán található *deleted in colorectal carcinoma (DCC)* tumorszuppresszor gén adott szakaszának deléciója is gyakori jelenség az *MSS*-típusú daganatokban. A károsodás jellemzően súlyosan diszplastikus adenómákban figyelhető meg először, és a sporadikus *CRC*-k 70%-ában mutatható ki [6, 23]. A *DCC* fehérjének szerepe van az axonok képződésében, a sejtosztódás, a differenciáció, valamint az apoptózis szabályozásában [24].

A *survivin* gén fokozott működése már korai adenóma stádiumban is megfigyelhető. Az apoptózist indukáló fehérjék inhibitoraként működik, ezáltal megnövekedett expressziója összekapcsolható a fokozott proliferációval és az angiogenezissel, valamint az apoptózis gátlásával is [25].

A tumor protein *P53 (TP53 - p53)* tumorszuppresszor gén mutációja a késői adenóma stádium karcinómává történő átalakulásáért felelős. Az ép gén számos sejtfunkció szabályozásában vesz részt (például az apoptózis kiváltása, a sejtciklus leállítás, a DNS javítása vagy a túlélési szignál gátlása) azáltal, hogy a *p53* fehérje különböző gének transzkripcióját befolyásolja. A mutáns *p53* gén a daganatok megközelítőleg 70%-ában mutatható ki [26-28].

2.1.2.1.2. *MSI fenotípusú vastagbélrák*

Magas szintű mikroszatellita instabilitással (*MSI-H*) a vastagbél tumorer körülbelül 20%-a jellemezhető. Ezekre a daganatokra jellemző a kromoszomális stabilitás, főleg a jobb colonsfélben találhatóak, gyakran mucinózusak, többnyire rosszul differenciáltak, gyakoribbak nőkben, mint férfiakban, és jó prognózissal jellemezhetőek [29]. Az *MMR*

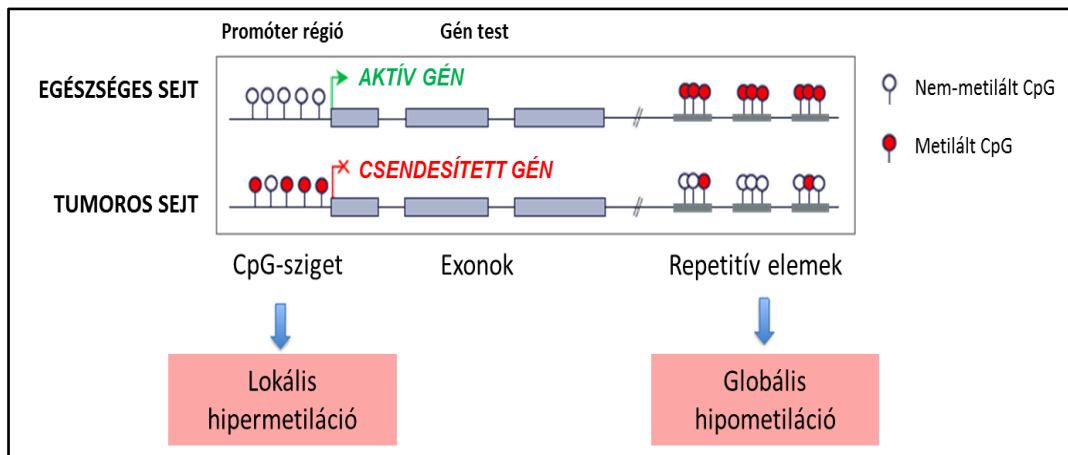
rendszer génjei közül leginkább a MutL Homológ 1 (*MLH1*) gén mutációja vagy hipermetilációja, illetve az MutS Homológ 2 (*MSH2*) gén mutációja figyelhető meg [30, 31]. Ezzel szemben az MSI-L daganatokban az *MLH1* és az *MSH2* is normális expressziót mutat [11]. A DNS-hibajavító O⁶-metilguanin-metiltranszferáz (*O⁶-MGMT*) gén azonban többnyire metiláció miatti inaktivitással jellemezhető [32]. Az utóbbi tumoroknak a többsége fogazott adenómából alakul ki, és kórlefeljárásuk jórészt az MSS daganatokhoz hasonlít [33].

2.1.2.2. Epigenetikai instabilitás – DNS-metiláció

A daganatok kialakulásában szerepet játszó epigenetikai módosulások közül a legjelentősebb a DNS citozin bázisát érintő metiláció. A folyamat során a pirimidin gyűrű 5. szénatomjának hidrogén atomja metil-csoportra (–CH₃) cserélődik [34]. A metiláció a citozin-guanin dinukleotid (CpG) helyeken történik, amelyek többnyire a gének promóter régióiban helyezkednek el. A CpG-gazdag régiókat CpG-szigeteknek nevezzük (a CpG dinukleotidok legalább 60%-os arányban vannak jelen), amelyek fokozott metilációja a transzkripció csökkenését, vagy teljes gátlását okozza (4. ábra) [35]. A metil-csoport bizonyos transzkripciós faktorok kötődését fizikailag is gátolja, emellett pedig olyan metil-CpG kötő fehérjék megkötésére képes, amelyek további faktorokat toborozva a kromatin struktúra megváltozását, és ezáltal a gén inaktiválódását idézik elő [36-38]. A DNS metilációját DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimek katalizálják S-adenozil-metionin (SAM) metil-donor felhasználásával. Két fő metilációs enzim típust ismerünk: a fenntartó metilációért felelős DNMT1 enzimet, és a *de novo* metiltranszferázokat, a DNMT3a-t és a DNMT3b-t. A DNMT1 a DNS-replikáció során helyezi fel a metil-csoportot az újonnan szintetizált szálra a régi szálal templátként használva. Ezzel szemben a DNMT3 a metil-csoportok olyan citozinokra kerülését katalizálja, amelyek korábban még nem voltak metiláltak [39-41]. A metilációs mintázat eltörlését a DNS-demetiláz enzimek végzik, amelyek a ten-eleven transzlokációs (TET) enzimek közé tartoznak [42].

A DNS-metilációs mintázat az életkor előrehaladásával folyamatosan változik, amelyet kor-függő (age-related) A-típusú metilációnak nevezünk. A rákos elváltozások esetén azonban találunk olyan géneket, amelyek kifejezetten daganat-specifikus metilációs mintázatot mutatnak, amellett, hogy genomszintű globális hipometiláció történik (4.

ábra). Utóbbi esetben rák-függő (cancer-related) C-típusú metilációról beszélhetünk, ami többek között a CIMP+ fenotípusú daganatokban fordul elő [43].



4. ábra. A DNS metiláció folyamata egészséges és tumoros sejtekben. A daganat során jellemző az adott géneket érintő lokális hipermetiláció és a genom szintű hipometiláció. Az ábra Kandimalla és mtsai. (2013) alapján módosítva készült [44].

CIMP+ tumoroknak tehát akkor nevezhetjük a daganatokat, ha adott gének promóterében elhelyezkedő CpG-szigeteken hipermetiláció történik. A CIMP pozitivitás meghatározása során egy metilációs marker csoportot vizsgálnak meg, azonban az optimális csoport kialakításában egyelőre megoszlanak a vélemények [45]. A CIMP+ tumorok a vastagbélrákos esetek 10-15%-át alkotják. Ezekre a daganatokra jellemző, hogy többnyire idősebb nőbetegekben alakulnak ki, mikroszatellita instabilak, a *K-ras*, a *BRAF* és a Transzformáló Növekedési Faktor β Receptor II (*TGF β RII*) gyakran mutált, a *TP53* mutációja viszont elég ritka, továbbá az *MLH1* gén hipermetilációt mutat [43, 46].

2.1.3. A vastagbélrák patológiája

A CRC diagnosztizálása során a tumorok besorolása három fő szempont, a szövettani típus (typing), a differenciáltsági fok (grading) és a stádium (staging) alapján történik. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ajánlása szerint a szövettani jellemzők alapján a következő csoportokat különböztetjük meg: adenokarcinóma; mucinózus karcinóma; pecsétgyűrű-sejtes rák; laphámrák; adenoszkvamózus rák; kissejtes rák; differenciálatlan karcinóma és adenokarcinoid tumor. A differenciáltsági szövettani meghatározás során az a döntő, hogy a tumorban milyen mértékű a mirigyképződés. A fentiek alapján beszélhetünk jól (minimum 75%-os mirigyképződés), közepesen (25-

75%-os) és rosszul (25% alatti) differenciált tumorokról. A stádiumokba történő besorolást elsőként Dukes és mtsai. javasolták [47], majd később ezt Astler és Coller módosította [48]. Napjainkban a következő CRC stádiumokat különböztetjük meg:

Dukes A: a daganat csak a mukózát érinti;

Dukes B1: a daganat betérjed a lamina muscularis propria rétegbe;

Dukes B2: a daganat áttöri az izomréteget és betérjed a subserosába;

Dukes C1: a daganat a muscularis propria réteget érinti, és nyirokcsomó érintettség van;

Dukes C2: a daganat áttöri a serosát, nyirokcsomó érintettség megfigyelhető;

Dukes D: a daganat távoli áttéteket képzett.

Egy másik osztályozási módszer az Unio Internationalis contra Cancrum (UICC) és az American Joint Committee on Cancer (AJCC) szervezet által közösen kialakított TNM-rendszer. Ebben a felosztásban a 'T' jelenti a primer tumort, az 'N' a nyirokcsomó érintettséget, és az 'M' a metasztázist. Az 1. táblázat összefoglalja a vastagbél-daganatok klinikai osztályozási rendszereit.

1. táblázat. A vastagbél-daganatok klinikai besorolása. A táblázat Akkoca és mtsai. (2014) alapján módosítva készült [49].

AJCC stádium	TNM beosztás	TNM kritériumok	Dukes stádium	Astler - Coller stádium
Stádium 0	Tis N0 M0	Tis: <i>in situ</i> karcinóma, a daganat a mukóza rétegre korlátozódik	-	-
Stádium I	T1 N0 M0	T1: a daganat a nyálkahártyát és szubmukózát érinti	A	A
Stádium I	T2 N0 M0	T2: a daganat betérjed az izomrétegbe	A	B1
Stádium II - A	T3 N0 M0	T3: a tumor a szubserosán túlterjed	B	B2
Stádium II - B	T4 N0 M0	T4: a daganat a környező szerveket is eléri	B	B3
Stádium III - A	T1-2 N1 M0	N1: áttétek 1-3 környező nyirokcsomóban, T1 vagy T2	C	C1
Stádium III - B	T3-4 N1 M0	N1: áttétek 1-3 környező nyirokcsomóban, T3 vagy T4	C	C2, C3
Stádium III - C	bármely T N2 M0	N2: áttétek 4 vagy több nyirokcsomóban, bármely T	C	C1, C2, C3
Stádium IV	bármely T N1-2 M1	M1: távoli szervi áttét igazolható, bármely T és N	-	D

2.1.4. A vastagbélrák diagnosztikai és szűrőmódszerei

A CRC korai felismerése nagyban növelheti a páciensek túlélési esélyeit. A vastagbélrák jellegzetes tünetei a megváltozott széklethabitus, a vashiányos vérszegénység, a véres széklet, a hasi fájdalom, a fogyás, az étvágytalanság és a hőemelkedés vagy a láz. A diagnózis felállítását azonban nehezítheti, hogy a tünetek egy része csak a betegség előrehaladott fázisaiban jelentkeznek. Az 5 éves túlélési esély egy Dukes C stádiumú CRC-s betegnél 40% alatti, Dukes D stádiumban, mikor már távoli áttét is kialakult ennél jóval alacsonyabb (5% alatti), viszont a korai Dukes A stádium esetén még 90%-os [50, 51]. Egy tanulmány az amerikai és európai, különböző Dukes stádiumú CRC-s betegek 3 éves túlélési esélyeinek összehasonlítása során nem talált szignifikáns különbséget az eltérő származású betegek között [52]. A túlélési

esélyeket a daganat elhelyezkedése is befolyásolhatja, hiszen a jobb colonfélben található tumorok esetén a túlélési esély 59%-os, míg bal colonfél esetén csak 65%-os [53]. A fenti adatok is alátámasztják, hogy kulcsfontosságú a betegség mielőbbi felismerése, ezért lényeges a szűrőmódszerek folyamatos fejlesztése. A szűrések kiemelt céljai közé tartozik a rák megelőző, adenóma állapot azonosítása is, hiszen a felnőtt lakosság 25%-ában igazolható adenóma, amelynek 5%-a alakul át rosszindulatú daganattá [54, 55]. Nemzetközi ajánlások alapján a CRC kialakulása szempontjából megkülönböztetünk alacsony, közepes és magas kockázatú csoportokat. A szűrést a közepes (családi halmozódás, adenómák jelenléte, anamnézisben CRC) és a magas (FAP-szindróma, HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), gyulladós bélbetegségek) rizikójú csoportba tartozók esetén kifejezetten ajánlott elvégezni [54, 56-58]. A szűrőmódszerek legfontosabb tulajdonságai a következők: megbízhatóság, megfelelő arányú részvétel, alacsony megterhelés, alacsony szövődményi ráta és költséghatékonyság. A szűrőmódszereket két nagy csoportba sorolhatjuk, az invazív vagy eszközös vizsgálatokra, illetve a non-invazív széklet vagy minimálisan invazív vérvétel alapú vizsgálatokra.

2.1.4.1. Eszközös vizsgálatok

A kolonoszkópia a legelfogadottabb és leghatékonyabb, ún. gold standard CRC szűrési módszer. Előnyei közé tartozik, hogy az esetek több, mint 90%-ában a teljes vastagbél átvizsgálható, lehetőség van a szöveti mintavételre, elvégezhető az endoszkópos polipektómia és a beavatkozás szenzitivitása magas. A módszer a kisebb polipokra 75%-os, a nagyobbakra 90%-os szenzitivitással rendelkezik, a vastagbélrákot pedig 90% feletti érzékenységgel találja meg. A folyamat azonban költséges, a betegek számára megterhelő és a szövődmények kialakulásának aránya is viszonylag magas, ezért a páciensek részvételi aránya alacsony [59-61].

A flexibilis szigmoidoszkópia során egy körülbelül fél méteres endoszkóppal végzik a beavatkozást, emiatt azonban a proximális vastagbélszakasról nem kapunk információt és a CRC-s esetek jelentős része nem kerül felismerésre. A flexibilis szigmoidoszkópia olcsóbb a kolonoszkópiás vizsgálatnál, kevésbé terheli meg a betegeket, valamint a szövődmények kialakulására is kisebb az esély. A specificitása CRC esetén 94%-os, szenzitivitása viszont jóval alacsonyabb, mint a kolonoszkópiáé [62, 63].

A kettős kontrasztos irrigoszkópia legnagyobb hátránya a betegeket érő sugárterhelés, továbbá a folyamat során nincs lehetőség biopsziák levételére és terápiás beavatkozásra, valamint nagy mértékű előkészítést igényel és szenzitivitása is alacsony. Az érzékenysége nagyobb polipokra 75% körüli, rosszindulatú vastagbél-daganatok esetén pedig 85-95%-os [63-65].

A virtuális kolonoszkópia eljárások közé tartozó computer tomográfiát (CT) alkalmazó CT-colonográfia (CTC) képalkotó vizsgálattal a vastagbél teljes szakasza vizsgálható, azonban a beteg sugárterhelés éri, és a nyálkahártya kisebb szerkezeti eltéréseit nem jeleníti meg. A szövődmények aránya alacsony, és szedációt ritkán igényel, ezért részvételi aránya viszonylag magas. Érzékenysége kis méretű (<1cm) polipok és flat adenómák esetén alacsony, viszont rosszindulatú daganatok esetén 95% feletti [66].

2.1.4.2. Non-invazív szűrővizsgálatok

Az eszközös vizsgálatok mellett egyre népszerűbbé és elérhetőbbé válnak a betegeket kímélő, nem invazív, vagy minimálisan invazív szűrőmódszerek. A székletben megjelenő vér kimutatására használt guajak alapú fecal occult blood test (gFOBT) a klinikai gyakorlatban használt egyszerű eljárás, ami a hemoglobin vagy hem-pseudoperoxidáz-aktivitását méri. Alkalmazásával elsősorban a nagyobb méretű, vérző polipokat és a már kialakult tumorokat lehet diagnosztizálni. Téves pozitívást okozhat bizonyos ételek és gyógyszerek fogyasztása, ezért a vizsgálat előtt speciális diéta ajánlott [67]. Használatával a CRC mortalitása 15-33%-kal és incidenciája 20%-kal csökkenthető [68]. A teszt szenzitivitása adenómákra 12%-os, *in situ* karcinóma esetén 40%-os, míg invazív CRC esetében 60% körüli, a specificitása pedig 85% felettinek adódik [69, 70]. Szintén székletvér kimutatásával működő teszt a humán hemoglobinra specifikus, immun-alapú FIT (fecal immunochemical test) teszt. A vizsgálat előtt speciális diétát nem kell tartani, hiszen a teszt nem lép reakcióba a nem humán eredetű hemoglobinnal. A módszer érzékenysége rosszindulatú daganatok esetén eléri a 60-85%-ot, adenómák esetén kevésbé szenzitív, specificitása azonban magas értékeket mutat [64, 70, 71]. Léteznek olyan szűrőmódszerek is, amelyek a székletben található DNS daganat esetén megjelenő abnormális eltéréseit, például mutációkat és metilációs mintázatot elemzik [72, 73]. A Cologuard® (Exact Sciences Corporation, Madison, WI, USA) teszt egy FDA-engedéllyel (Food and Drug Administration) rendelkező széklet-alapú DNS-teszt, amely mutáció- és metiláció-specifikus molekuláris próbákat

tartalmaz. Az Imperiale és mtsai. által készített tanulmány alapján a teszt magasabb érzékenységgűnek bizonyult CRC esetén, mint a FIT, viszont az adenómák kimutatására kevésbé hatékony [74].

Az utóbbi időkben kezdtek előtérbe kerülni a vér-alapú szűrési technikákat bemutató kutatások, amelyek különböző biomarkerek azonosítását tűzték ki célul. A 'folyadék biopszia' (liquid biopsy) eljárás legnagyobb előnye, hogy minimálisan invazív, és a betegek számára a legkevésbé kényelmetlen technika. Ezek a tesztek olyan markerek kimutatására törekszenek, amelyek kifejezetten az adott betegségre specifikusak, és a daganat kialakulása során bekövetkező genetikai és epigenetikai eltéréseket jelzik [75]. A vérben található szabad, sejten kívüli DNS (skDNS) molekulák elemzése alkalmas módszer lehet a daganatok korai diagnosztizálására.

2.2. A sejten kívüli szabad DNS jellemzése

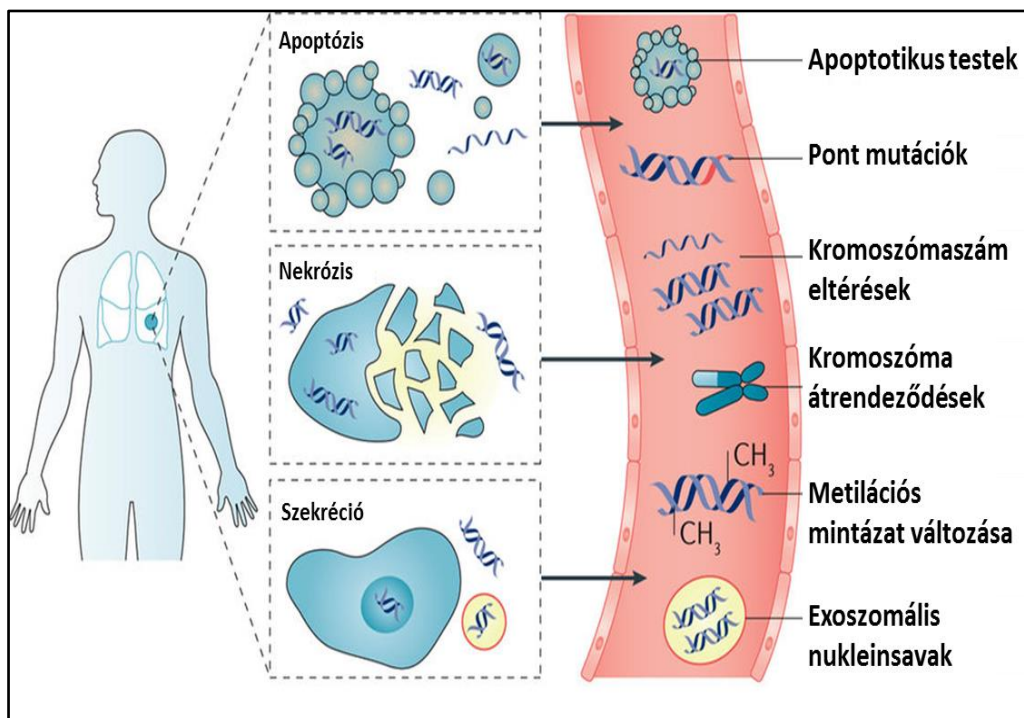
2.2.1. A szabad DNS felfedezése

A sejten kívüli nukleinsavak kimutatása Mandel és Metais nevéhez fűződik, akik először észlelték a vérplazmában keringő DNS és RNS molekulákat. Kvantitatív technikákat alkalmazva megfigyelték, hogy egészséges és különféle betegségekben szenvedő páciensek vérében egyaránt előfordulnak extracelluláris nukleinsavak [76]. Később szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegek vérében mutattak ki DNS ellen termelődő ellenanyagokat [77, 78]. A korai vizsgálatok során azt feltételezték, hogy az skDNS kizárólag patogén folyamatok révén kerülhet a véráramba, később azonban Anker és mtsai. leírták, hogy vérből izolált limfocita sejtek *in vitro* képesek DNS molekulákat kibocsátani a környezetükbe, amelyek mennyisége nem arányos a nekrotizált sejtekkel [79]. A keringő DNS mennyisége és a daganatok kialakulása közötti kapcsolatot először Leon és mtsai. vizsgálták, akik először tudták mérni az skDNS koncentrációját anti-DNS antitestek használatán alapuló radioimmunoassay módszerrel [80]. Megfigyelték, hogy rosszindulatú daganatos betegekben magasabb a szabad DNS mennyisége, mint az egészséges egyéneknél vagy jóindulatú tumorok esetén. Mérésük szerint az egészséges mintacsoportban az skDNS koncentrációja 13 ± 3 ng/ml, míg rákos betegekben 180 ± 38 ng/ml. Összefüggést találtak a szabad DNS mennyisége és a kezelés hatékonysága között, hiszen a hatásos kezelés alacsony skDNS koncentrációt eredményezett, a hatástalan azonban nem befolyásolta a mennyiséget. Leírták továbbá, hogy metasztázis kialakulásakor még

inkább megemelkedik az skDNS mennyisége (209 ± 39 ng/ml), mint az áttétképződés nélküli betegekben (100 ± 30 ng/ml). Kutatócsoportjuk azt feltételezte, hogy a DNS vagy az osztódó rákos sejtekből, vagy a tumorsejtekkel kapcsolatba kerülő egészséges sejtekből származik [80]. Az 1980-as évek végén találtak először bizonyítékot arra, hogy a tumoros betegek vérplazmájában található DNS neoplasztikus tulajdonságokkal bír, amely a daganatból való eredetre utal [81]. Később több közlemény is említi, hogy tumor-specifikus mutációk találhatók az skDNS frakcióban, például N-ras mutáció akut myeloid leukémiában [82], vagy K-ras mutáció hasnyálmirigy adenokarcinómában [83]. Ezek után számos közlemény számolt be a keringő DNS genetikai és epigenetikai változásairól, beleértve a mikroszatellita instabilitást, a heterozigótaság elvesztését vagy a metilációs mintázat megváltozását [84].

2.2.2. A szabad DNS eredete

A szabad DNS eredetére vonatkozóan több elmélet is található a szakirodalomban, amelyek szerint alapvetően két fő útvonalon kerülhet daganat esetén a DNS a véráramba: a sejt halálának bekövetkezése után apoptózissal vagy nekrozissal, illetve az élő egészséges és tumoros sejtek által aktívan kibocsátva (5. ábra) [85, 86]. A legvalószínűbb azonban, hogy ezek a folyamatok együttesen zajlanak le a szervezetben.



5. ábra. A szabad DNS származásának lehetséges módjai: apoptózis, nekrozis és direkt szekréció. A kibocsátás részletes mechanizmusa, élettana egyelőre csak részben ismert.

A véráramba kerülő DNS molekulák egyszálú és kétszálú formában is jelen vannak, valamint hordozzák a tumorra jellemző molekuláris mintázatot. Az ábra Wan és mtsai. (2017) alapján módosítva készült [85].

Az élő sejtekből származó DNS aktív kiválasztásának lehetőségét számos publikáció felveti, azonban egyértelmű bizonyíték még nem született [87]. A limfocita sejtekről már korábban bebizonyosodott, hogy képesek *in vitro* DNS molekulák kibocsátására [88], valamint az is ismert, hogy a neutrofil granulociták extracelluláris neutrophil csapdákat (NET - neutrophil extracellular traps) ürítenek a vérbe, amelyek többek között mitokondriális és genomiális DNS szakaszokat is tartalmazhatnak [89]. A NETózis folyamata elsősorban a patogének elleni védekezés során játszódik le, de megfigyelték szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegek vérében is [90]. A szabad DNS féléletideje 16 perc körüli, valamint ismert, hogy a DNS nemcsak önmagában, hanem komplexként is jelen lehet a vérben [91, 92]. Kapcsolódhat sejtmembrán részekhez, DNS-kötő fehérjékhez, különböző vezikulákban vagy virtoszómákban is megtalálható [93]. Több tanulmányban leírták már, hogy az exoszómákhoz köthető DNS molekulák nagyobb mérettartományban a membránhoz kapcsolt formában találhatók, míg a kisebb méretű szakaszok az exoszómák belsejében helyezkednek el [94, 95]. Az skDNS újgenerációs szekvenálási módszerekkel történő vizsgálata rámutatott arra is, hogy a gazdaszervezeten kívüli, idegen (nem humán eredetű vagy non-host) szekvenciák is jelen vannak a véráramban. Ezek a DNS szekvenciák az elfogyasztott táplálékból, valamint a szervezetben élő mikrobákból származhatnak [96, 97].

2.2.3. A szabad kDNS mennyiségi és minőségi jellemzői

A daganatokban megnőtt skDNS szint a DNS lebontását végző DNáz enzimek mérsékelt működésének, valamint a DNáz inhibitorok emelkedett mennyiségének is köszönhető [98]. A fentieket figyelembe véve a szabad DNS gyógyszeres kezelések célpontjaként is szolgálhat, hiszen a mesterségesen bejuttatott DNáz I enzim, mint potenciális tumorellenes ágens csökkenti a szabad DNS mennyiségét, ezáltal bizonyítottan gátolja a daganatsejtek proliferációját és áttétképző képességét. Patutina és mtsai. igazolták, hogy a daganatos egerek vérplazmájában jellemző magas DNS koncentráció és alacsony DNáz aktivitás DNáz kezelés után a normális, fiziológias szintűre változik [98-100].

Egyes tanulmányok *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel is alátámasztották feltételezésüket, amely szerint a daganatból kijutó, genetikai és epigenetikai eltéréseket is tartalmazó DNS a véráramba kerülés után felvételre is kerülhet bizonyos sejtek által. A bekerülő DNS így malignizálhatja az egészséges sejteket, hozzájárulva a metasztázisok kialakulásához [87]. A fenti folyamatot genometasztázisnak nevezzük. García-Olmo és mtsai. patkányok bőre alá oltott kloramfenikol acetil transzferáz (CAT) transzsgén tartalmazó DHD kolorektális adenokarcinóma sejtvonalból származó tumorsejteket, majd ezekből a patkányokból származó vérplazmát adtak intraperitonálisan egészséges állatoknak. Néhány hét múlva sikerült kimutatniuk a CAT transzsgén jelenlétét az egészséges állatokban is, azaz a tumorsejtek genetikai információjának megjelenését. További kísérletekkel igazolták, hogy vastagbélrákban szenvedő betegek vérplazmáját médiumnak használva különböző sejtvonalak malignusan transzformálhatók, majd ezek a sejtek patkányokba oltva szintén tumor progressziót okoznak [101]. Anker és mtsai. megfigyelték, hogy humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal (SW480) felülúszójának hozzáadásával egér fibroblaszt sejtek (NIH/3T3) tumorossá alakíthatók [102].

Az skDNS mennyiségének emelkedése önállóan nem használható a daganatok biomarkereként, hiszen fokozott szabad DNS mennyiség nemcsak betegség, hanem többek között erőteljes fizikai aktivitás vagy a terhesség első trimesztere során is megfigyelhető [103, 104]. Daganatos megbetegedés esetén azonban a tumor szövetéből kikerülő DNS olyan tulajdonságokkal bír, amelyek kifejezetten az adott tumorra specifikusak, úgymint szomatikus mutációk, rendellenes mikroszatellita mintázatok, és olyan epigenetikai változások, mint a tumor-specifikus DNS metilációs mintázat [105]. A vastagbélrák kialakulása során a korábban említett genetikai változások (mutációk) nagy gyakorisággal megtalálhatók a tumorszövetben, a vérmintákban azonban kisebb hányadban mutathatók ki ezek az eltérések [106, 107]. Ennek ellenére számos tanulmány mutatott be CRC-specifikus biomarkerként használható mutációkat, amelyek mellett napjainkban a metilációs markerek kutatása is előtérbe került.

2.3. A vastagbélrák molekuláris markerei

Biomarkereknek nevezzük az olyan objektíven mérhető jelzőanyagokat, amelyek kimutatása adott betegség jelenlétére vagy annak bizonyos jellemzőjére utal. A biomarkerek lehetnek DNS-, RNS- vagy fehérjealapúak, illetve a módosítás típusa

szerint megkülönböztetünk genetikai és epigenetikai markereket is [108]. A klinikai gyakorlatban használt markereket négy csoportba oszthatjuk: 1. diagnosztikus markerek, a betegség korai felismerésére; 2. prognosztikus markerek, amelyek a betegség várható előrehaladását mutatják; 3. prediktív markerek, a kezelés hatékonyságának jelzésére; illetve 4. túlélési markerek, melyek a daganat visszatérését jósolják meg [109]. A hagyományos szűrőmódszerek kiegészítéseként ezek a markerek nagy segítséget nyújthatnak a vastagbél-daganatok incidenciájának és mortalitásának csökkentésében.

2.3.1. Genetikai markerek

2.3.1.1. Szöveti biomarkerek

A vastagbél-szövetben kimutatható genetikai markerek közül a már korábban említett *APC*, *TP53*, *KRAS* és *BRAF* a legintenzívebben vizsgált gének. Az *APC* csírasejtes mutációi prognosztikus markerekként jelzik a FAP-szindrómát, illetve szomatikus mutációi korai fázisban jelzik a sporadikus vastagbél adenómák és rosszindulatú daganatok kialakulását. Az 1286-os és 1513-as kodonok között elhelyezkedő mutációkat a tumorerő közel 70%-ában meg lehet találni [110-112]. A tumorszuppresszor *TP53* gén mutációinak felhalmozódása elsősorban a CRC invazivitásához járul hozzá. Az adenómákban alacsony hányadban fordulnak elő, azonban a tumorerő 60-75%-ában kimutathatók [113-115]. A mutációk többsége (körülbelül 80%-a) missense mutáció, és ezek jórészt öt kodonban (175, 245, 248, 273 és 282) található meg [116]. A klinikai gyakorlatban is használt prediktív markerek közé tartoznak a *KRAS* és a *BRAF* gének pontmutációi, amelyek a Ras-Raf-MEK-ERK jelátviteli út konstitutív aktiválódásához vezetnek. A *KRAS* gén hibái a CRC-s betegek 30-50%-ában jelentkeznek, és elsősorban a 2. exon 12-es és 13-as kodonjában, valamint a 3. exon 61-es kodonjában vannak jelen [117]. Azoknál a betegeknél, akiknél a *KRAS* gén mutáns, nem alkalmazható az EGFR-ellenes célzott terápia, azaz a cetuximab és a panitumumab kezelés sem célravezető [118]. A *BRAF* génben történő mutációk a CRC-k 10%-ában figyelhetők meg [119], és leggyakrabban valin-glutamin aminosav cserét eredményeznek (*BRAF*_{V600E}). A hibás *BRAF* génnel rendelkező tumorerő inkább jobboldali elhelyezkedésűek, nőkben és idősekben gyakrabban fordulnak elő és mikroszatellita instabilitással párosulnak [120, 121]. A *BRAF* mutációja szintén okozhat

rezisztenciát az EGFR-gátlók adásakor abban az esetben is, ha a *KRAS* gén vad típusú [122].

2.3.1.2. Szérum/plazma DNS markerek

A vérben található szabad DNS frakció vizsgálata az utóbbi időben intenzíven kutatott terület. A vastagbél adenóma és tumor szövetében található genetikai módosulásokat hordozó DNS szakaszok kikerülhetnek a véráramba, ezáltal plazma, illetve szérum mintákból is elemezhetőek. A mutációk azonban eltérő gyakorisággal mutathatók ki a vérben, mint a szöveti mintákban. Kidess és mtsai. a betegek 50%-ában találtak mutáns *KRAS* gént a tumorszövetben, ami a párosított plazmák minták mindössze 39%-ában volt csak kimutatható [123]. Egy másik kutatócsoport eredményei azonban azt mutatták, hogy a mutáns gén magasabb arányban van jelen a plazmamintákban (26/52), mint a vastagbél biopsziákban (15/52) [124]. Számos tanulmány több gén mutációját együttesen elemezte. Wang és mtsai. a *KRAS* mutáció mellett az *APC* és a *TP53* géneket is vizsgálták szöveti mintákban és szérumban [107]. A szöveti minták elemzésekor a vastagbélrákos betegek 75%-ában találtak legalább egy génben mutációt, ami szérum esetén csak 46,2%-nak adódott. Az *APC* az esetek 30,4%-ában, a *KRAS* gén 34%-ban, míg a *TP53* gén 34,2%-ban volt mutáns a CRC-s betegek szérum mintáiban. Lilleberg és mtsai. szintén ezt a mutációs panelt elemezték a *BRAF* génnel kiegészítve, és minden CRC mintában találtak legalább egy mutáns gént [125]. Egy másik tanulmány pozitív korrelációt figyelt meg az *APC*, a *KRAS* és a *TP53* gének mutációja, és a nyirokcsomó áttét jelenléte között. Megállapították, hogy a *KRAS* és *APC* mutációk elsősorban a regionális áttétekkel függenek össze, míg a mutáns *TP53* a peritoneális metasztázis megjelenése esetében gyakoribb [126].

2.3.2. Epigenetikai markerek

Az epigenetikai jelenségek magukban foglalnak minden olyan, gének működését befolyásoló módosítást, amelyek magában a DNS szekvenciában nem okoznak változást. Ide soroljuk - többek között - a DNS-t érintő metilációt, a hiszton módosításokat, a nukleoszóma pozicionálást, illetve a nem-kódoló RNS-ek által végzett poszt-transzkripció módosításokat [127]. Ezek az epigenetikai változások a genetikai eltérésekkel párhuzamosan történnek a daganat kialakulása során, ezért potenciális markerekként szolgálhatnak a tumorok szűrésére, diagnosztikára és prognosztikára egyaránt [128].

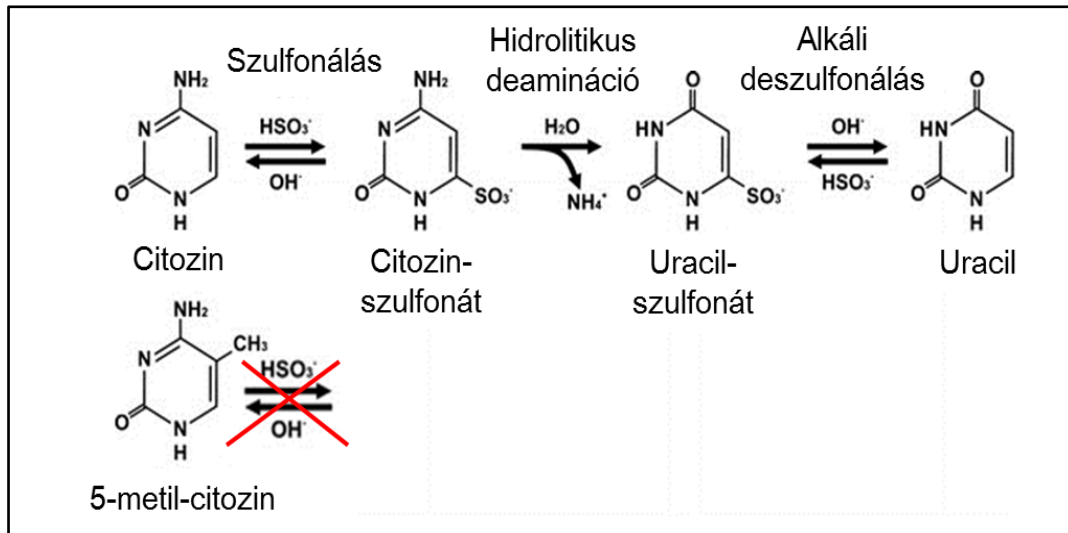
2.3.2.1. DNS metilációs markerek

A DNS molekulákat érintő metiláció az egyik legjelentősebb epigenetikai esemény, amely már a tumorképződés korai szakaszában is megjelenik. A daganatokban bekövetkező metilációs mintázat változások közé a promóter régióban található CpG-dinukleotidok lokális hipermetilációja, a DNS molekulák globális hipometilációja és az imprinting elvesztése tartozik [129]. Az aberránsan metilált DNS ígéretes biomarkerként szolgálhat a vastagbélrák esetében is, hiszen a szöveti mintákon kívül a székleletben, plazmában, szérumban és egyéb testfolyadékokban is megtalálható [130].

2.3.2.1.1. DNS metiláció vizsgálatára alkalmazott módszerek

A DNS metiláció vizsgálatán alapuló technikák két fő csoportba sorolhatók attól függően, hogy a teljes genomban található metil-citozinok szintjét, vagy egy adott gén metilációs állapotát elemzik.

A teljes genom metilációs állapotának meghatározása során olyan régiókat azonosíthatunk, amelyek metilációja adenóma, illetve CRC állapotban megváltozik az egészséges mintákhoz képest. A módszereket csoportosíthatjuk az alapján, hogy enzimátikus emésztést, affinitás- alapú dúsítást vagy biszulfid konverziós kezelést használnak [131]. A gyakran alkalmazott technikák közé tartozik a Metilált-DNS Immunprecipitáció (MeDIP) módszer, amely során az 5'-metil-citozinra specifikus ellenanyagok segítségével történik a dúsítás, amit microarray (MeDIP-chip) vizsgálat vagy szekvenálás (MeDIP-seq) követ. Az előbbihez hasonló technika a Methyl Capture (MetCap) szekvenálás, amely a precipitációhoz a Metil-CpG kötő fehérje (MeCP2) metil-kötő doménjét alkalmazza. A biszulfid-konverziós kezelésem alapuló módszerek bázisonként adnak információt a metilációs státuszról, és specifikus DNS-szekvenciák elemzésére, valamint teljes genom analízisre egyaránt használhatók. A biszulfid átalakítás során azok a citozinok, amelyek metil-csoportot tartalmaznak, nem változnak, azonban a nem-metilált citozin nukleotidok a biszulfid konverzió hatására uracillá alakulnak át (6. ábra). Attól függően, hogy a citozin metilált vagy nem-metilált volt, különbségek lesznek a DNS szekvenciájában, és ezek az eltérések további módszerekkel kimutathatóak.



6. ábra. A biszulfit konverzió folyamata. Nátrium-biszulfit jelenlétében a metil-csoporttal nem rendelkező citozin nukleotidok nukleofil támadást szenvednek, emiatt uracillá alakulnak át. A metil-csoport jelenléte azonban megakadályozza ezt, ezért a citozin molekula változatlan marad. Az ábra Hatakeyama és mtsai. (2013) alapján módosítva készült [132].

A teljes genom metilációs állapotát vizsgáló módszerek közé tartoznak a különböző metilációs array-k, a teljes genom biszulfit szekvenálás és az RRBS (reduced-representation bisulfite sequencing) technika. Az Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip módszerrel a biszulfit konverziót és amplifikálást követően 477.000 CpG-sziget metiláltsági foka mérhető oligonukleotid próbák segítségével.

Adott gének, vagy előre kijelölt DNS régiók metilációs státuszának vizsgálatára szintén számos lehetőség kínálkozik. Ezek többsége is biszulfit konverziós lépéssel indul, de endonukleázokkal történő szelektív emésztéssel is történhet [133]. A HpaI enzim a nem-metilált CCGG szekvenciát emészt, az MspI enzim viszont inszenzitív a metilációra, tehát minden esetben emészt a szekvenciát. Az enzimatikus hasítások után gélelektroforézissel vagy PCR-rel kimutatható a metiláció helye [133, 134]. A fenti elven működik a Qiagen EpiTect Methyl II PCR Array, amely segítségével párhuzamosan 96 gén metilációs állapotát határozhatjuk meg metiláció-függő és metiláció-független hasító enzimek használatával. A biszulfit konverziót alkalmazó technikák közé tartozik - többek között - a hagyományos Sanger, illetve a

piroszekvenálás, a biszulfít-specifikus PCR-t (BSP) követő nagyfelbontású olvadáspont elemzés, a metiláció-specifikus PCR (MSP) vagy a MethyLight PCR (ML-PCR) [133].

A hagyományos szekvenálás kidolgozása Frederic Sanger nevéhez fűződik, aki kifejlesztette a didezoxi-lánctermináción alapuló szekvenálási módszert [135]. A reakció eredetileg radioaktívan jelölt DNS primert tartalmazott, valamint egyszálú DNS templátot, DNS polimerázt, illetve dezoxi- és radioaktívan-jelölt didezoxinukleotidokat [136]. Viszonylag magas költsége, időigényessége és az újabb technikák megjelenése miatt ez a módszer egyre inkább háttérbe szorul, a rutin diagnosztikában azonban a mai napig alkalmazzák.

A piroszekvenálást 1996-ban dolgozták ki, amely módszer a „szekvenálás szintézissel” elven alapszik [137]. Az egyszálú DNS templát alapján egy komplementer szál szintetizálódik, és a nukleotid beépülését követően pirofoszfát (PPi) keletkezik. Ennek mennyiségét lehet mérni egy kapcsolt reakcióval, amit a luciferáz enzim jelez fényfelvillanással. Létezik szilárd és folyékony fázisú piroszekvenálás is [137, 138]. Az első esetében a DNS templátokat poliszitíren gyöngyökre rögzítik, az utóbbiban viszont enzimátikus kezeléssel készítik elő. A reakcióban polimeráz, ATP-szulfuriláz, luciferáz enzimeken kívül apiráz enzim is részt vesz. Továbbá több bázispár olvasható le a segítségével, mint a szilárd fázisú technikával.

A BSP technika során az amplifikált szakaszokban a metilált citozinok nem változnak, azonban a nem-metiláltak timinként fognak szerepelni. A reakció során az oligonukleotidok a vizsgálni kívánt citozinokon kívül helyezkednek el. A DNS kettős szálban a C-G nukleotidok között három, az A-T nukleotidok között viszont kettős hidrogénhid kötés alakul ki. A PCR során interkalálódó festéket alkalmaznak (például SYBR vagy Eva green), amely a DNS szálba bekötve intenzíven fluoreszkál, a hőmérséklet emelés hatására azonban a szálak denaturálódnak, és így a fluoreszcencia lecsökken. Az eredetileg metilált szekvenciák a hármas hidrogénhid kötésnek köszönhetően magasabb hőmérsékleten fognak disszociálni, mint a nem-metilált szakaszok, így a folyamat során kapott olvadási görbéből következtethetünk a metiláció fokára. A fenti technikát metiláció-specifikus nagy felbontású olvadáspont elemzésnek (MS-HRM) nevezzük [139].

Az MSP során két primer-párt kell tervezni, az egyik az eredetileg nem-metilált szekvenciákat amplifikálja fel, a másik a metiláltakat. A primerek tervezésénél ügyelni

kell arra, hogy az oligonukleotidok átfedjenek az elemzett CG dinukleotidokkal. Minden minta esetében két reakciót kell elvégezni, és a relatív metilációs szintet az áttörési pontok (cycle threshold, Ct-érték) különbségeként lehet kiszámítani. A módszer segítségével viszonylag gyorsan meg lehet határozni a kiválasztott CpG helyek metilációs státuszát. A ML-PCR ehhez hasonló, de érzékenyebb módszer annyi különbséggel, hogy a primerek mellett egy fluoreszcens Taqman-próbát is alkalmaznak, amelyek szintén CpG helyekre illeszkednek [140]. A Taqman-próba egy rövid egyszálú oligonukleotid, amelynek végeihez különböző fluoreszcens csoportok (egy riporter és egy kioltó [quencher] fluorofór) kapcsolódnak. A detektálás a fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET) jelenségen alapszik.

2.3.2.1.2. Szöveti biomarkerek

Az irodalomban számos olyan metilációs markert leírtak, amelyek a vastagbélrák kialakulásához járulnak hozzá, és vastagbél szöveti mintákból kimutathatók. Lao és mtsai. hat gént (*SLC5A8*, *SFRP1*, *SFRP2*, *CDH13*, *CRBP1* és *RUNX3*) és két lókuszt (*MINT1* és *MINT31*) találtak, amelyek hipermetilációt mutattak már aberráns kriptá fókuszokban is [141]. Hat másik metilált gént (*p14*, *HLTF*, *ITGA4*, *CDKN2A/p16*, *CDH1* és *ESR1*) azonosítottak adenóma minták esetén és négyet (*TIMP3*, *CXCL12*, *ID4* és *IRF8*) előrehaladott CRC-ben, amelyek összefüggésben állhatnak az áttétek képződésével is. A *SPARC* gén emelkedett metilációs szintjét a limfovaszkuláris invázióval hozták összefüggésbe [142]. Az *MLH1* metilációs mintázatát a sporadikus MSI vastagbeldaganat és a familiáris forma elkülönítésére lehet alkalmazni [143]. Egyes gének metilációjának változását a kemorezisztenciával is összekapcsolták [144]. A legtöbb tanulmány nem egy gén metilációs állapotát vizsgálja, hanem több markert tartalmazó panelt alkalmaznak a daganat kimutatására [145-147]. Ezzel a megközelítéssel nagyobb biztonsággal lehet diagnosztizálni az adenómákat vagy tumorokat, mint ha csak egy gén metilációjának módosulását követnénk nyomon. Kim és mtsai. 10 hipermetilációt (*ADHFE1*, *BOLL*, *SLC6A15*, *ADAMTS5*, *TFPI2*, *EYA4*, *NPY*, *TWIST1*, *LAMA1* és *GAS7*) és 2 hipometilációt (*MAEL* és *SFT2D3*) mutató gént neveztek meg, amelyek CRC mintákban szignifikánsan eltértek a normális pároktól [148]. Munkacsoportunk 18 gén metilációs státuszát elemezte piroszekvenálás módszerrel [149]. Hat gén (*COL1A2*, *SFRP2*, *SOCS3*, *BCL2*, *PRIMA1* és *PTGDR*) hipermetiláltnak mutatkozott CRC biopszia mintákban az egészségesekhez képest, amelyből 3 marker már adenóma stádiumban is fokozott metilációs szintű volt. A fenti

adatok azt jelzik, hogy szöveti szinten számos markert leírtak, amelyek metilációjának megváltozása összeköthető a tumorok kialakulásával, azonban nagy érdeklődés övezi a nem invazív beavatkozással járó tesztek fejlesztését is. Ez utóbbiaknak köszönhetően ugyanis a DNS metilációs mintázata széklet vagy vérmintákból is elemezhető.

2.3.2.1.3. Széklet biomarkerek

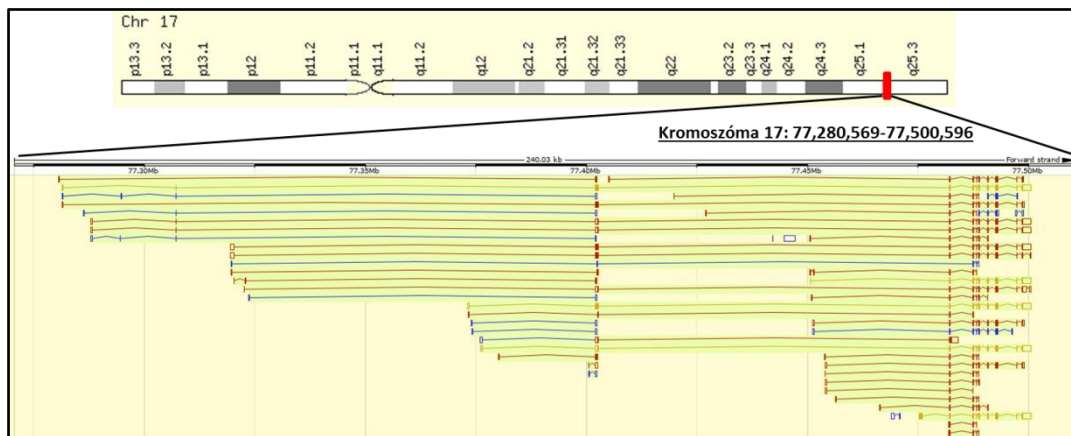
A vastagbél faláról leváló és a székletbe kerülő sejtek DNS metilációs mintázata könnyen elemezhető. Mivel a mintavétel nem igényel invazív beavatkozást, a széklet-alapú diagnosztikai vizsgálatok klinikai jelentősége meghatározó. A leginkább tanulmányozott markerek az *SFRP2* és a vimentin (VIM) [150]. Az *SFRP2* volt az elsőként leírt metilációs marker, amely a székletben 77-90%-os szenzitivitással és 77%-os specificitással bírt CRC esetén [151]. Wang és mtsai. azt is megfigyelték, hogy a marker alkalmas lehet a vastagbélrák kiújulásának jóslására is [151]. A vimentinről is bebizonyosodott, hogy egészséges vastagbél hámsejtekben nem mutat metilációt, azonban a daganatos betegek 53-86%-ában metilálódik 46%-os szenzitivitással és 90%-os specificitással értékekkel [152]. Számos egyéb marker székletmintákban való fokozott metilációját leírták tumor esetén, beleértve az *APC*, *p16*, *MLH1*, *MGMT*, *SFRP1* és *FBNI* géneket [153]. Bizonyos gének metilációja a karcinogenezis különböző stádiumaiban jellemző, például az *SLC5A8*, *SFRP1*, *SFRP2*, *CDH13*, *CRBP1*, *RUNX3*, *MINT1* és *MINT31* gének fokozott metilációja aberráns kriptá fókuszra jellemző; a *p14*, *HLTF*, *ITGA4*, *p16*, *CDH1* és *ESR1* metilációja az aberráns kriptá fókusz – adenóma átmenetben figyelhető meg; míg a *TIMP3*, *CXCL12*, *ID4* és *IRF8* gének a CRC-ben és az áttétek kialakulásakor metilálódnak [153].

2.3.2.1.4. Szérum/plazma DNS markerek

A daganat szövetéből a nukleinsavak bekerülhetnek a véráramba, így a különböző epigenetikai módosítások, többek között a DNS metiláció mértéke a szérumban, illetve plazmában található skDNS frakcióban is vizsgálható. Pack és mtsai. öt gént választottak ki, amelyek szerepet játszanak a CRC patogenezisében (*FHIT*, *APC*, *SMAD4*, *E-cad* és *DAPK1*), és ezek metilációs státuszát vizsgálták egészséges (n=60), adenómás (n=40) és CRC-s (n=60) betegcsoportokban [154]. Elemzésük azt mutatta, hogy a CRC kimutatására legérzékenyebb marker az E-cadherin 60%-os szenzitivitással és 84%-os specificitással, amit az *APC* követ 57%-os érzékenység és 86%-os specificitással értékekkel. Az I. stádiumú tumorokat a legnagyobb valószínűséggel az *APC*

marker tudta elkülöníteni a nem-daganatos mintáktól. Egy másik kutatócsoport szintén több marker metilációs állapotát vizsgálta együttesen (*RUNX3*, *p16*, *RASSF1A* és *CDH1*) metiláció-specifikus PCR módszerrel szérumban mintákban [155]. Megállapították, hogy a CRC-s betegek 82%-ában a négy gén közül legalább egy hipermetilált volt. Herbst és mtsai. a *HLTF* és a *HPPI* gének metilációs állapotának elemzése során megállapították, hogy a *HLTF* gén metilációja a tumor méretével és stádiumával is erősen korrelál [156]. Egy másik kutatócsoport az *ALX4* gén metilációjának emelkedését figyelte meg vastagbél-daganatos betegekből származó szöveti és szérumban mintákban egyaránt [157]. Lofton-Day és mtsai. 2008-ban megjelentetett közleményükben 3 metilációs markert (*TMEFF2*, *NGFR* és *SEPT9*) vizsgáltak, és azt találták, hogy a septin 9 (*SEPT9*) gén tudta a legnagyobb érzékenységgel és specificitással elkülöníteni a CRC-s mintákat az egészségesektől [158]. A munkacsoport a későbbiekben több megerősítő kísérletben elemezte a marker megbízhatóságát, valamint módosította a protokollt a szenzitivitás és specificitás növelése érdekében [159-161]. A *SEPT9* metilációján alapuló technika a legismertebb, kereskedelmi forgalomban lévő, az Epigenomics cég által fejlesztett Epi proColon 2.0 néven is kapható non-invazív vastagbélrák szűrő tesztté nőtte ki magát.

A *SEPT9* gén az evolúció során fennmaradt, GTPáz supercsoportba tartozó, GTP-kötő fehérjéket kódoló septin család tagja. A génnek jelenleg 47 transzkriptuma (splice variánsa) ismert, amelyek közül 34 proteint kódoló (7. ábra).



7. ábra. A *SEPT9* gén genomiai felépítése. Ábra forrása: www.ensembl.org.

A kódolt fehérjék szerepet játszanak a citokinezis, a sejtciklus/apoptózis, a vezikula transzport, a sejt polaritás és a mikrotubuláris rendszer szabályozásában [162]. A *SEPT9* promóter régiójában számos CpG dinukleotid helyezkedik el, amelyek metilációs

státusza befolyásolja a fehérjék kifejeződését. Habár a *SEPT9*-et elsősorban vastagbélrák-specifikus markernek tartják, megváltozott metilációs státuszát más daganatokban is megfigyelték. Egy tanulmányban a *SHOX2* és a *SEPT9* metilációját együttesen vizsgálták epeúti daganatos betegekben, és megállapították, hogy a panel 45%-os szenzitivitással és 99%-os specificitással tudja megkülönböztetni a tumoros mintákat az egészségektől [163]. Egy másik csoport az Epi proColon 2.0 teszttel a gyomorrákos minták 49,4%-át, a nyelöcsőrakok 35%-át és a hasnyálmirigy daganatok 57,1%-át tudta kimutatni [164]. Bennett és mtsai. fej-nyaki tumorokban elemezte a *SEPT9* metilációs státuszt és a rákos minták 56%-át azonosították a módszerrel [165]. Az Epigenomics cég által fejlesztett Epi proColon 2.0 teszt azonban a vastagbélrákos páciensek vér-alapú diagnosztizálására szolgál. A módszert használva a *SEPT9* metiláció 68-72%-os szenzitivitás és 89-93%-os specificitás értékekkel képes a CRC kimutatására, a teszt azonban elsősorban az előrehaladott stádiumok felismerésében megbízható, adenóma és korai CRC esetén alacsonyabb az érzékenysége [106, 160, 166]. A *SEPT9* metilációja nem mutat különbséget a bal- illetve jobb-lokalizációjú daganatok között, a bal colonfélben 96%-os, míg a jobb oldaliakban 94%-os *SEPT9* pozitivitás figyelhető meg [167]. Az Epigenomics-on kívül más cégek is fejlesztettek a *SEPT9* gén metilációján alapuló szűrőtesztet (például az Abbott Molecular, Quest Diagnostics és ARUP Laboratory), amelyek változó érzékenységgel képesek a CRC kimutatására [166, 168].

2.3.2.2. Egyéb epigenetikai markerek

A DNS metiláción kívül egyéb epigenetikai módosítások is befolyásolják a fehérjék kifejeződését, ilyenek többek között a nem-kódoló RNS molekulák általi szabályozó mechanizmusok. A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, 18-25 nukleotidból álló, fejlődéstanilag konzervált nem-kódoló RNS-ek, amelyeknek fontos szerepük van a cél mRNS-ek expressziójának poszt-transzkripciós szabályozásában. A miRNS-ek részt vesznek a sejt differenciáció, a metabolizmus, a proliferáció és az apoptózis regulációjában, ezáltal a megváltozott kifejeződésük számos daganattípusban megfigyelhető [169]. Mivel a különböző testfolyadékokban, így vérben is kimutathatóak, a cirkuláló extracelluláris miRNS-ek potenciális non-invazív biomarkerként szolgálhatnak a daganatok kimutatására [170]. Először Chen és mtsai. azonosítottak 69 miRNS-t Solexa-alapú szekvenálással, amelyek csak a daganatos betegek szérumban mintáiban találhatóak meg, az egészségesekben nem [171]. Ezek után

számos tanulmányban írtak le alul- és felülszabályozódó miRNS-eket a rákos betegek szérum- és plazmamintáiban [172, 173]. A leginkább vizsgált miRNS-ek a miR-92a, a miR-21, a miR-221 és a miR-141, amelyek szintje CRC-ben megemelkedik, és korrelációt mutatnak a rossz prognózissal és a metasztázis képzéssel is [173-176]. Napjainkban intenzív kutatások tárgyát képezik a hosszú, nem kódol RNS-ek (hnkRNS). Ez a csoport 200 bázispárnál hosszabb, fehérjét nem-kódoló RNS-eket tartalmaz, amelyek szintén megtalálhatóak a különböző testfolyadékokban, ezáltal biomarkerekként is szolgálhatnak. A hnkRNS-ek közvetett módon szabályozzák a génexpressziót, képesek bizonyos fehérjék, köztük transzkripciós faktorok kötésére, a kromatinstruktúra módosítására, szolgálhatnak molekuláris állványként (scaffold-molekula), de köthetnek miRNS-eket is, illetve maguk is kódolhatnak miRNS-eket [177].

3. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során a következő célokat tűztem ki:

1. A sejten kívüli szabad DNS felszabadulásának vizsgálata SHO egér/HT-29 kolorektális adenokarcinóma sejtvonal xenograft modell alkalmazásával;
2. a szabad DNS stabilitásának meghatározása mesterségesen létrehozott és egészséges, valamint tumoros C57BL/6 egerek véráramába juttatott metilált és nem-metilált DNS szakaszok degradációjának nyomon követésével;
3. négy (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) előzetesen kiválasztott DNS metilációs marker vizsgálata egészséges, adenómás és vastagbélrákos betegek vastagbél szövet- és plazmamintáiban;
4. a négy vizsgált marker DNS metilációs mintázatának *in silico* validációja bioinformatikai módszerekkel független szöveti mintákon;
5. a DNS metilációs változás fehérje expresszióra gyakorolt hatásának elemzése a kolorektális adenóma – karcinóma szekvencia során;
6. különböző DNS izolálási módszerek hatásának vizsgálata az izolált szabad DNS mennyiségére és a 4 tanulmányozott gén DNS metilációs mintázatára;
7. a *SEPT9* gén DNS metilációs szint változásának összevetése az általunk összeállított biomarker pannellel.

4. MÓDSZEREK

4.1. Betegek és minták

Kísérleteink folyamán állatmodellekkel, és humán vastagbél szövet- és plazmamintákkal dolgoztunk. Az egérkísérletek során a sejten kívüli DNS felszabadulását (8 db egér) és degradációját (8 db egér) tanulmányoztuk a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Állatházának közreműködésével. Az Intézet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével rendelkezik (Ikt.sz.: 22.1/1159/3/2010). Az állatok tenyésztése és kezelése alatt a Semmelweis Egyetem kísérleti állatok gondozására ajánlott leírásait követtük. Az állatkísérletek során SHO egér/HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal xenograft modellel, valamint egészséges és C38 egér kolorektális adenokarcinóma sejtvonalból származó tumorsejtekkel oltott C57BL/6 egerekkel dolgoztunk. Ezek után négy kiválasztott gén – az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* – DNS metilációs státuszát elemeztük egészséges, adenómás és vastagbélrákos betegek szövet- és plazmamintáiban. A DNS metilációs vizsgálatunk esetén metodikai optimalizációt végeztünk, amelynek során eltérő kézi és automatizált szabad DNS izolálási módszereket és különböző vérvételi gyűjtőcsöveket teszteltünk. Végül az EpiGenomics cég által kifejlesztett *SEPT9* génszakasz vizsgálatán alapuló, vastagbélrákra specifikus diagnosztikai rendszert tanulmányoztuk különböző módszerekkel, és vetettük össze az általunk létrehozott DNS metilációs biomarker panel hatékonyságával. Humán vizsgálatainkhoz a szövet- és vérmintákat a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük össze a Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKÉB) engedélyével (69/2008; 116/2008; 23.970/2011). A páciensek a TUKÉB által jóváhagyott beleegyező nyilatkozatot adták a minták kutatási célra történő felhasználásához, miután teljes körű tájékoztatást kaptak a vizsgálatokról. Minden kutatásba bevont páciens rutin kolonoszkópiás vizsgálaton esett át, majd a minták osztályozása szakértő patológusok által történt. A rosszindulatú daganatos minták stádiumbeosztása a TNM rendszer alapján történt. Vizsgálatainkból minden olyan beteget kizártunk, akinek vastagbél tumoron kívül egyéb daganatuk vagy bármilyen krónikus betegségük is volt, illetve kemo- vagy sugárterápiát kaptak. Összesen 193 egészséges/NAT, 191 adenómás (AD) és 254 vastagbélrákos (CRC) páciens szövet- és plazmamintáját elemeztünk különböző módszerekkel. A vizsgálatainkba bevont humán

eredetű minták típusát, számát és az alkalmazott vizsgálati technikákat a 2. táblázatban szemléltettem.

2. táblázat. A vizsgálatainkba bevont humán minták típusai. Rövidítések: TCGA – The Cancer Genome Atlas; GEO – Gene Expression Omnibus; NAT – normal adjacent tissue (tumoros betegből ép vastagbél területről vett minta); CRC – vastagbélrák.

Alkalmazott módszer	Mintatípus	4 kiválasztott gén DNS metilációjának elemzése		
		Egészséges/NAT	Adenóma	CRC
Piroszekvenálás	Vastagbél szövet	15	15	15
MethyLight PCR	Plazma	37	37	47
MethyLight PCR	Vastagbél szövet	11	11	10
Immunsztokémia	Vastagbél szövet	11	11	10
<i>In silico</i> (MetCap Seq)	Vastagbél szövet	6	15	9
<i>In silico</i> (TCGA)	Vastagbél szövet	39	-	39
<i>In silico</i> (GEO - GSE48684)	Vastagbél szövet	17	42	64
Metodikai vizsgálat				
MethyLight PCR	Plazma	47	50	42
Septin 9 pozitívitas vizsgálata				
Duplex qPCR	Plazma	10	10	20
ESETSZÁM		∑ 193	∑ 191	∑ 256

4.2. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával

4.2.1. Sejten kívüli DNS felszabadulásának elemzése

Munkánk során az skDNS eredetének elemzését, valamint a felszabadulási ütemének és sebességének nyomon követését végeztük. A 8 héten keresztül tartó állatkísérletet egér-humán HT-29 tumor xenograft modell segítségével valósítottuk meg. Bioinformatikai

úton kiválasztott és előzetes kísérletekkel ellenőrzött egér és humán gének kópiaszámát vizsgálva következtettünk az állatok vérében megjelenő humán DNS mennyiségére, amelynek növekedését mértük az idő elteltével. Eredményeink segítségével megállapítottuk a humán tumorsejtekből az egerek keringési rendszerébe kerülő skDNS frakció arányát, ezáltal mérhettük a felszabadulás ütemét.

4.2.1.1. Xenograft-modell előállítása, vérvétel, DNS izolálás

A szabad DNS felszabadulásának elemzésére SHO egér/HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonalt xenograft modellt használtunk. Az SHO (SCID Hairless Outbred) egereket 2007-ben állította elő a *Charles River Research Models* cég, 2 törzs (Crl:HA-*Prkdc^{scid}* és Crl:SKH1-*Hr^{hr}*) keresztezésével. Az állatok homozigóták a *Prkdc^{scid}* és a *Hr^{hr}* mutációkra nézve, ami immundeficiens, albínó, szőrtelen egereket eredményezett. Ezt az egértörzset kifejezetten tumorbiológiai kutatások során alkalmazzák (www.criver.com). A humán HT-29 kolorektális adenokarcinóma sejtvonalból származó sejtek használata széles körben elterjedt, *subcutan* oltva könnyen tudnak osztódni az egerekben, több cm-es tumort kialakítva. Munkánk során nyolc darab SHO egeret 5×10^6 HT-29 sejtvonalból származó sejttel *subcutan* oltottunk (8. ábra).



8. ábra. Xenograft tumormodell kialakítása: 7. nap, 21. nap, 28. nap, 42. nap, 56. nap és 63. nap.

4.2.1.2. Plazma frakció szeparálása, DNS izolálás

Egészséges, kontroll állatoktól és a tumorsejtekkel oltott egerektől 8 héten keresztül heti egy alkalommal vért vettünk a szemzug vénán keresztül (~200 µl), steril EDTA/PBS (1x) csövekbe, amit feldolgozásig jégen tároltunk. A plazma frakció szeparálásához 10 perc 2000 rpm 4°C-on történő centrifugálása után a felülúszót leszívtuk, majd a felülúszót ismét 10 percig 4000 rpm fordulatszámmal 4°C-on centrifugáltuk. Az így nyert plazmamintákat steril Eppendorf csövekben további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A szabad DNS frakció kinyeréséhez a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kitet használtuk (Qiagen, Németország) a „Purification of Circulating DNA from 1ml, 2ml, or 3ml Serum or Plasma” protokoll gyártói leírása szerint. Az eluálást 150 µl PCR-tiszta vízzel végeztük. Az skDNS koncentrációjának megállapítására Qubit 1.0 fluorimétert alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific, USA) a Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit használatával. Az izolált DNS-t 4°C-on tároltuk.

4.2.1.3. Primerek tervezése

Az skDNS egér/humán arányának megállapításához 6 egér és 6 humán eredetű mitokondriális és genomiális gén kópiaszámát vizsgáltuk (3. táblázat). A gének kiválasztásában és a primerek tervezésében a legfontosabb szempont a magas fokú fajspecifitás volt. A primer-párokat Primer3 programmal terveztük, majd az oligonukleotidokat egységesen 100 µM-os (100 pmol/µl) törzsoldatra hígítottunk, majd a PCR során 200 nM végkoncentrációban alkalmaztuk. A primer-párok *in silico* tesztelésére a BiSearch szoftvert használtuk (<http://bisearch.enzim.hu>) [178].

3. táblázat. Az egér/humán DNS arányának meghatározására használt 6 egér és 6 humán mitokondriális és genomiális génekre tervezett primerek szekvenciái. Rövidítések: e – egér; h – humán.

Gén neve	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia
<i>e12S</i>	AGGTTTGGTCCTGGCCTTAT	CGGTCTATGGAGGTTTGCAT
<i>e16S</i>	GGGATAACAGCGCAATCCTA	ATTGGGATGTCCTGATCCAA
<i>eMT_6836</i>	CACATTTCGAGGAACCAACCT	CCAATTTTAGGGGGTTTCGAT
<i>eND4</i>	GGAACCAAACCTGAACGCCTA	ATGAGGGCAATTAGCAGTGG
<i>eTNFa</i>	TGTTGCCTCCTCTTTTGCTT	TGGTCACCAAATCAGCGTTA
<i>eTLR5</i>	GCCTCTAAGGGCTCTCACCT	TGGAGGGAAACCATGTCATT
<i>h12S</i>	ACCACCTCTTGCTCAGCCTA	CATGGGCTACACCTTGACCT
<i>h16S</i>	GTACCGCAAGGGAAAGATGA	TTGGCTCTCCTTGCAAAGTT
<i>hMT_15195</i>	TATCCGCCATCCCATACATT	GTGTGAGGGTGGGACTGTCT
<i>hND4</i>	CGCCTCACACTCATTCTCAA	TGTTTGTCTAGGCAGATGG
<i>hMYOD_1</i>	GGAAGCAGCTGGTACTGGTC	GGGCAGGGACTGATTACTA
<i>hOCA2_3</i>	CCTCAGGACCCTGTGATGAT	TTTCAAGGTGCCCAGATTTC

4.2.1.4. Valós idejű polimeráz láncreakció

A plazmából izolált DNS mintákon valós idejű polimeráz láncreakciót (real-time PCR, RT-PCR) végeztünk LightCycler 480 típusú készüléken (Roche Applied Science, Svájc). A reakciót 10 µl végtérfogatban mértük össze, amely tartalmazta a LightCycler® 480 Probes Master mixet (2x) (Roche Applied Science), az izolált DNS mintát, az 50x SYBR Green I interkalálódó festéket (Thermo Fisher Scientific) és a tervezett primer-párokat (200nM) a gyártói utasításoknak megfelelően. A PCR során 384 lyukú multiwell plate-eket használtunk, amelyekbe a reagensek és DNS minták pipettázása az Eppendorf epMotion 5070 pipettázó automata (Eppendorf, Németország) segítségével történt a beprogramozott utasítások szerint. Minden plate tartalmazott nyolc mintát duplikátumban, PCR-tisztaságú desztillált vizet negatív kontrollként, valamint egy 7 tagból álló kalibrációs hígítási sort. Ehhez viszonyítva tudtuk következtetni az egér/humán DNS arányára, és megállapíthattuk a kísérleti modellünk érzékenységét. A polimeráz láncreakció során az alábbi hőciklusokat alkalmaztuk:

- denaturáció: 95°C 5 min;
- 50 amplifikációs ciklus: 95°C 10 sec, 60°C 10 sec, 72°C 10 sec;
- olvadáspont analízis: folyamatos emelkedéssel 95°C 5 sec;

- hűtés: 65°C 1 min és 40°C 30 sec.

A képződött PCR termékek specificitását és tisztaságát a ciklus végén zajló olvadáspont (melting curve) analízissel ellenőriztük. A PCR készülék képes detektálni a reakcióhoz használt interkalálódó SYBR Green I festék gerjesztéséből származó fluoreszcencia emisszióját, ami arányos a keletkezett kétszálú DNS mennyiségével. A mért fluoreszcencia intenzitásokat a ciklusszámok függvényében a készülékhez tartozó szoftver grafikusan ábrázolja (LightCycler 480 Software release 1.5.0). Végeredményként az amplifikációs görbék második deriváltjának maximumaként kalkulált Ct-értéket (Cycle threshold=áttörési pont) kapjuk meg, amely segítségével megállapíthatjuk a kiindulási templát DNS koncentrációját, amiből következtetni tudunk az egér-eredetű DNS-háttérben lévő humán HT-29 sejtekből származó DNS mennyiségére.

4.2.1.5. A valós idejű PCR során használt hígítási sor előállítása

A hígítási sor felállítása során különböző arányban elegyítettünk egér vérből, illetve humán HT-29 sejtvonalból származó sejtekből kivont DNS-t. A DNS izolálása a HT-29 sejtkultúrából a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science) „Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Whole Blood, Buffy Coat, or Cultured Cells” protokoll segítségével a gyártó utasításai szerint történt. A vérből történő izolálás a következő protokoll alapján valósult meg:

- 300 µl vér
- 500 µl 2% SDS (nátrium dodecil-szulfát) (Sigma-Aldrich, USA)
- 100 µl Proteináz K enzim (Qiagen)
 - inkubálás: 10 min 60°C Eppendorf Thermomixer Comfort-ban (Eppendorf)
- 500 µl telített fenol (Sigma-Aldrich)
- 100 µl BCP (1-bróm-3-klórpropán) (Sigma-Aldrich)
 - 10 min 8000 rpm centrifugálás
- Felülúszó leszívása
- Nukleinsav frakció kicsapása 70 v/v% izopropanollal
- DNS tisztítása QIAamp Genomic DNA Minikit (Qiagen) oszlopon
- QIAvac 24 Plus vákuum szivattyút (Qiagen) használata
- Mosás 2x 70%-os etanollal (1-1 ml), 1x abszolút etanollal (700 µl)

- Szárítás 3 min 20000 rpm-en centrifugálva
- Eluálás 2x 75 µl PCR-tiszta desztillált vízzel

Az izolált DNS minták koncentrációjának mérése NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) spektrofotométerrel történt. A mérés után a mintákat 1 µg/ml-es végkoncentrációra hígítottuk, mert előzetes méréseink alapján a plazma DNS koncentrációja ebben a tartományban mozog. A különböző arányú egér/humán elegyeket a 4. táblázat szerint állítottuk össze.

4. táblázat. A humán és egér DNS %-os aránya az elegyítés során a 7 tagból álló hígítási sor felállításához.

Humán DNS %-os aránya (%)	Egér DNS %-os aránya (%)
0,03	99,97
0,1	99,9
0,4	99,6
1,5	98,5
6,25	93,75
25	75
100	0

4.2.1.6. A tumorszövet vizuális vizsgálata

A tumorszövetet az állatok feláldozása után eltávolítottuk, majd 10%-os pufferolt formaldehidben fixáltuk. A rögzítés elsődleges célja, hogy a sejtekben található fehérjéket denaturáljuk, és így az enzimatis bomlási folyamatokat leállítsuk. A fehérjék denaturációja következtében a szövet megkeményedik, így további feldolgozásra, metszésre alkalmassá válik. A fixálás után víztelenítést követően, a mintákat paraffin blokkba ágyasztuk és 3 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Ezután hematoxilin-eozin festést (HE) végeztünk. A hematoxilin az ún. neutrális festékek közé tartozik, és a leggyakrabban használatos magfestő szer, míg az eozin a plazma festésére alkalmas. A tárgylemezek digitalizálása a Panoramic 250 Flash II digitális szkennelrel történt (3DHISTECH Kft.), majd Panoramic Viewer (ver.:1.15.3; 3DHISTECH Kft.) szoftver segítségével vizualizáltuk a metszeteket.

4.2.2. Sejten kívüli DNS degradációjának vizsgálata

A kísérletünk során mesterségesen létrehozott, majd egerek véráramába juttatott DNS szakaszok degradációját tanulmányoztuk. A vizsgálatot *in vitro* metilált és nem-metilált

DNS fragmentumokkal egészséges és tumorsejttel oltott egereken végeztük. Specifikus RT-PCR próbák használatával figyeltük meg a DNS degradációjának folyamatát, és következtetéseket vontunk le a DNS stabilitására vonatkozóan.

4.2.2.1. C38 tumormodell előállítása

A szabad DNS degradációs kísérlethez négy egészséges és négy C38 egér kolorektális adenokarcinóma tumorsejtekkel oltott C57BL/6 egeret használtunk. A C38 törzstenyészetből származó 5x5x5 mm-es nem nekrotizáló tumorszövet darabokat subcutan oltottuk, majd a kezelést az oltást követő 21. napon végeztük.

4.2.2.2. DNS izolálása, mesterséges DNS szakasz létrehozása, tisztítása

Az egerek kezeléséhez szükséges DNS szakaszok előállításához először HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonalból DNS-t izoláltunk a High Pure PCR Template Preparation Kittel (Roche Applied Science) az „Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Whole Blood, Buffy Coat, or Cultured Cells” protokoll szerint a gyártó utasításait követve. Ezután megterveztük a kiválasztott DNS szakasz amplifikálásához szükséges primert a Primer3 programmal, a gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) gén körülbelül 3000 bp-méretű szakaszára (GDH_X1) (5. táblázat). Az izolált DNS mintákat PCR során amplifikáltuk Eppendorf Mastercycler ep Gradient S PCR készülékben (Eppendorf) 50 µl végtérfogatban, amely tartalmazta a 2x LightCycler Probes Master mixet (Roche Applies Science), az 5x Q puffert (Qiagen), 20 ng HT-29 sejtvonalból izolált DNS templátot és a tervezett primert (200 nM). A PCR hőciklusai a következők voltak:

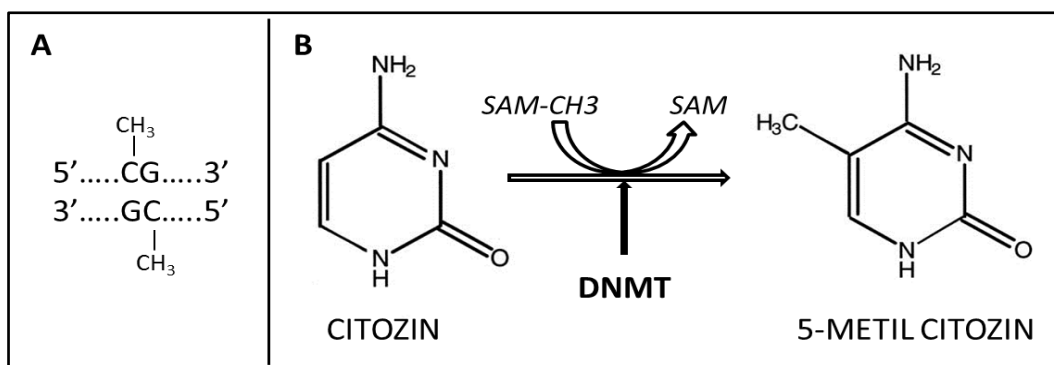
- denaturálás: 94°C 5 min;
- 35 amplifikációs ciklus: 94°C 3 sec, 60,5°C 30 sec, 72°C 3 min;
- extenzió: 72°C 2 min;
- hűtés: 4°C.

A reakciótermék specifikusságát etidium-bromid interkalálódó festéket tartalmazó 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A mintákat kontroll DNS (marker) mellett 70 V feszültségen 30 percig választottuk el, majd a DNS templát láthatóvá tétele UV-fény használatával történt. A felszaporított DNS szakaszt tisztítottuk: 80 v/v% ACL puffert (Qiagen), 180 v/v% ACB puffert (Qiagen) és 140 v/v% izopropanolt adtunk a mintához, majd -20°C-on 14 órán keresztül inkubáltuk. Ezután az elegyet QIAamp Mini oszlopra (Qiagen) pipettáztuk, és QIAvac 24 Plus (Qiagen) vákuum szivattyú használatával

tisztítottuk a DNS-t. A mosást 2x 1-1 ml 70%-os, majd 700 µl abszolút etanollal végeztük. Az oszlop szárítása 3 perc 20.000 rpm-en történő centrifugálással zajlott. Az eluálás RNáz- és DNáz-mentes desztillált vízzel történt 150 µl-ben. A minta koncentrációját NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) spektrofotométerrel mértük.

4.2.2.3. PCR termék metilálása

A tisztított PCR terméket 2 db egészséges és 2 db tumoros egérnek metilált formában, míg a másik csoportba tartozó egereknek nem-metilált formában injektáltuk. Az *in vitro* metilálás (9. ábra) során 1 µg-nyi PCR termékhez 1 µl SssI CpG metiltranszferáz (4U/µl) enzimet (BioLabs, New England), 3µl 1x NE 2 puffert és 160 µM végkoncentrációjú S-adenozil metionint (SAM) adtunk, majd a reakciót egy órán keresztül 37°C-on, majd 20 percig 65°C-on inkubáltuk. A tisztítást, majd a koncentráció mérését a 4.2.2.2. fejezetben leírtak szerint végeztük.



9. ábra. CpG Metiltranszferáz (M.SssI) enzim metilációs helye és a DNS-metiltranszferáz enzimek működése. Rövidítések: DNMT – DNS-metiltranszferáz; SAM – S-adenozil metionin.

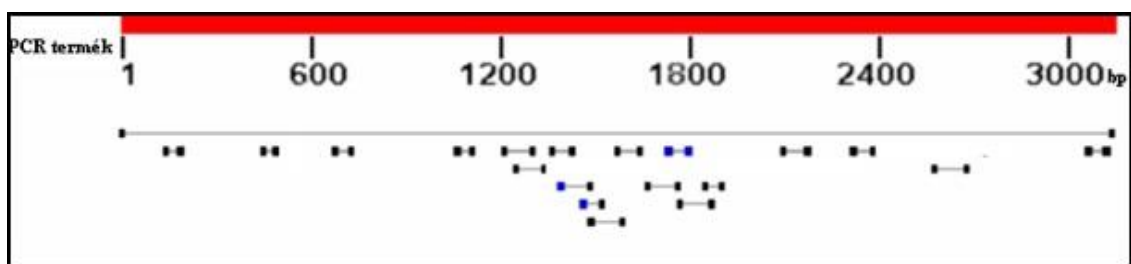
4.2.2.4. PCR termékkel történő kezelés, vérvétel és DNS izolálás

700 µl tisztított PCR terméket tartalmazó oldathoz 700 µl PBS-t (2x) pipettáztunk, majd ebből 300-300 µl-t (100 ng tisztított DNS-t) injektáltunk 2 egészséges és 2 tumoros egér fark vénájába. A további 4 egeret párhuzamosan a metilált PCR termékkel kezeltük azonos módon. A 8 db egértől 5 alkalommal vettünk vért, közvetlen a kezelés előtt, majd a kezelés után 1, 3, 6 és 24 órával. A vérvétel szemzug vénán keresztül történt, steril EDTA/PBS (1x) csövekbe, amelyeket a plazma frakció szeparálásáig jégen tároltunk. A frakció kinyeréséhez 10 perc 2000 rpm 4°C-on történő centrifugálást követően a felülúszót új csöbe mértük, majd újra centrifugáltuk 10 percig 4000 rpm 4°C-on. A plazmamintákat -20°C-on tároltuk. A szabad DNS frakció izolálását a

QIAamp Circulating Nucleic Acid kittel végeztük (Qiagen), a „Purification of Circulating DNA from 1ml, 2ml, or 3ml Serum or Plasma” protokoll alapján, a gyártói leírás szerint.

4.2.2.5. *Primerek tervezése és valós idejű PCR*

A plazma frakcióból izolált DNS mintákra 19 specifikus, egyenletesen elhelyezkedő és egymással átfedő PCR primer-párt (próbát) használtunk a 3000bp méretű bejuttatott humán DNS szakasz kimutatására (10. ábra, 5. táblázat). A primerek tervezése Primer3 program segítségével történt.



10. ábra. A PCR termékre tervezett specifikus primerek elhelyezkedése.

5. táblázat. A mesterségesen létrehozott, egerek véráramába bejuttatott PCR termékre tervezett primerek szekvenciái. Rövidítések: GDH – gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén.

PCR próba szimbólum	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia
<i>GDH_XI</i>	TTAGGAAAGCCTGCCGGTGA	GTCAGCGTCAGAGCCCAGTG
<i>GDH_A</i>	CCGGGAGAAGCTGAGTCAT	CACCAGAGGGGCCATTTT
<i>GDH_B</i>	CTCTCTCCCATCCCTTCTCC	GAAATCAGGAGTGGGAGCAC
<i>GDH_C</i>	TCCTGCCCTTTGAGTTTGAT	CTAGCTCAGCTGCACCCTTT
<i>GDH_D</i>	TGCCTTCTTGCTCTTGCTCT	GTAAAAGCAGCCCTGGTGA
<i>GDH_E</i>	AAAGCTGGTGTGGGAGGAG	AATTTGCCATGGGTGGAAT
<i>GDH_EF</i>	CCCCTTCATACCCTCACGTA	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
<i>GDH_F</i>	AATCCCATCACCATCTTCCA	AGCCACACCATCCTAGTTGC
<i>GDH_FG</i>	TGAGTGGAAGACAGAATGGAAG	GAGATGGGGACAGGACCATA
<i>GDH_G</i>	TATGGTAACCTTGTGTCCCTCA	TTGATTTGGAGGGATCTCG
<i>GDH_GH</i>	TATGGTCTGTCCCATCTC	CTCCATGGTGGTGAAGACG
<i>GDH_H</i>	TCCACTGGCGTCTTCACC	CCTTGCAGGGCTGAGTC
<i>GDH_HI</i>	CCCGGGTTCATAACTGTCTG	TTCACACCCATGACGAACAT
<i>GDH_I</i>	CATCATCTCTGCCCCCTCT	GATGATCTTGAGGCTGTTGTCA
<i>GDH_IJ</i>	CATGGGTGTGAACCATGAGA	CAAGTCAGGGGAGCGTGT
<i>GDH_J</i>	CCTGGCACCTATGGACA	AGGCATTGCTGCAAAGAAAG
<i>GDH_K</i>	GGGACTGGCTTTCCATAAT	TGTGGTCTGCAAAGGAGTG
<i>GDH_L</i>	AAGGTCATCCCTGAGCTGAA	AGGTCCACCACTGACACGTT
<i>GDH_M</i>	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	AGAGTTGTCAGGGCCCTTTT
<i>GDH_N</i>	GGGAGGGACCTGGTATGTTC	AAATGGTTCTCGAAGCAAGC

A 19 primer-pár validálására egy 4 tagból álló hígítási sort mértünk össze a tisztított PCR termékekből, 200x-os kezdeti hígítással, majd 3-szor 80x-os lépésekkel. Ezután határoztuk meg a reakciók hatásfokait. A valós idejű PCR-t a 4.2.1.4. fejezetben leírtak szerint végeztük a 19 PCR termékre tervezett primerrel és 5 db kontroll, egér DNS-re tervezett primerrel: *eIL6*, *eTNF α* , *eTLR5*, *eTLR9*, *e18s* (6. táblázat). Előzetes tesztelés során bizonyítottuk, hogy ezek a primerek a humán DNS-t nem szaporítják fel, így ezekhez viszonyítva kvantifikálhattuk a kísérleti rendszert.

6. táblázat. A plazmaminták DNS tartalmának pontos meghatározásához használt primerek szekvenciái.

Gén neve	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia
<i>eIL6</i>	CTAGCCAGATGGTTTCTTGGGA	ATATTTAAATTAGCAATTCATTGAGGT
<i>eTNFα</i>	TGTTGCCTCCTCTTTTGCTT	TGGTCACCAAATCAGCGTTA
<i>eTLR5</i>	GCCTCTAAGGGCTCTCACCT	TGGAGGGAAACCATGTCATT
<i>eTLR9</i>	CGGGGACCTACAGCAGAATA	CGGGAACCAGACATGAAGAT
<i>e18s</i>	GCAATTATTCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC

A 8 db egértől 5 alkalommal levett vérből izolált DNS mintákat 3 párhuzamos reakcióban vizsgáltuk desztillált vizes negatív kontroll mellett. Az eredményként kapott Ct-értékekből következtettünk a degradáció mértékére, és összehasonlíthattuk az egészséges és tumoros, illetve a metilált / nem-metilált PCR termékek bomlásának ütemét.

4.3. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban

4.3.1. Mintagyűjtés

A négy kiválasztott marker (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) DNS metilációjának elemzése során összesen 166 beteg szövet- és plazmamintáit vizsgáltuk (7. táblázat). A piroszekvenálás elvégzésére 15 sebészileg eltávolított vastagbélrákos (CRC), 15 az eltávolított colónvég makroszkóposan ép (normal adjacent tissue - NAT) és 15 adenómás friss-fagyasztott szöveti mintát gyűjtöttünk; a MethyLight PCR vizsgálatokhoz 37 egészséges, 37 adenómás és 47 CRC-s betegtől vettünk vért, és párosított biopszia mintákhoz is hozzájutottunk 11 egészséges, 11 adenóma, 10 CRC páciens esetében. Az adenómák között szövettani besorolás szerint tubuláris (T), tubulovillózus (TV) és hiperplasztikus (HP) adenómákkal dolgoztunk. Eredményeink megerősítésére további 192 beteg DNS metilációs adatait *in silico* elemeztük.

7. táblázat. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálatába bevont páciensek klinikai adatai. Rövidítések: NAT – normal adjacent tissue; T – tubuláris; TV – tubulovillózus; HP – hiperplastikus; CRC – vastagbélrák.

Módszer	Változók	Egészséges/ NAT	Adenóma			CRC	
			T	TV	HP	Dukes A/B	Dukes C/D
<i>Piroszekvenálás</i>	<i>mintaszám</i>	15	10	5	0	9	6
	<i>átlag-életkor</i>	78	64	64	-	78	77
	<i>nem arány (Ffi/Nő)</i>	6/9	8/2	3/2	-	4/5	2/4
<i>MethyLight PCR</i>	<i>mintaszám</i>	37	20	14	3	27	20
	<i>átlag-életkor</i>	51	66	61	61	70	70
	<i>nem arány (Ffi/Nő)</i>	12/25	10/10	6/8	2/1	11/16	14/6

A perifériás vérmintákat 6 ml-es K3EDTA csövekbe (Greiner Bio-One GmbH, Ausztria) gyűjtöttük a páciensek könyökvénájából. A vérből 4 órán belül plazma frakciót szeparáltunk. A centrifugálás 1350 rcf fordulaton 12 percig szobahőmérsékleten történt, majd a felülúszó új csöbe mérése után megismételtük a lépést. A hemolizáló mintákat kizártuk a kísérletünkéből. A plazmákat további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A sebészileg eltávolított szöveti mintákat a levételt követően folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk le, majd a mintákat -80°C-on tároltuk.

4.3.2. A DNS metilációt mutató gének kiválasztása

Az *SFRP1*, az *SFRP2* és a *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálatára kutatócsoportunk korábbi piroszekvenálási eredményei szolgáltak alapul [149]. Egy további marker, az *SDC2* irodalmi adatok alapján került kiválasztásra [179, 180]. Annak érdekében, hogy az *SDC2* metilációjának változását kísérletes eredményekkel is igazoljuk, piroszekvenálási módszert alkalmaztunk GS Junior rendszer 454 technológia

(Roche Applied Science, Németország) használatával. A vizsgálat során 15 NAT, 15 adenóma és 15 CRC friss-fagyasztott szöveti mintát gyűjtöttünk.

4.3.3. Makrodisszekció

A sebészileg eltávolított friss fagyasztott vastagbél szöveti mintákat OCT beágyazó anyagba helyeztük (Sakura Finetek, Japán), amely a minták metszése során lehetővé teszi a szöveti struktúrák maximális megőrzését. Ezután 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk -20°C-os kriosztát készülékben, és a metszeteket Superfrost Ultra Plus (Thermo Fisher Scientific, USA) tárgylemezekre tettük, majd 70%-os etanollal 5 percig és abszolút etanollal két percig fixáltuk. A makrodisszekált mintákat toluidinkék festés után a metszetekről egyszer használatos tűvel lekaparva gyűjtöttük össze.

4.3.4. Biszulfít konverzió

A DNS metilációs státusz vizsgálatának egyik közvetett módszere a biszulfít átalakítás (6. ábra). A makrodisszekált mintákból történő DNS izolálást és biszulfít konverziót kapcsoltan az EZ DNA Methylation Direct Kit (Zymo Research, USA) segítségével hajtottuk végre. A Proteináz K-val történő emésztést 20 µl-ben végeztük a biszulfít konverziót megelőzően, az eluáló térfogat 20 µl volt.

4.3.5. Biszulfít-specifikus polimeráz láncreakció

A CpG Plot EMBOSS alkalmazás segítségével *in silico* CpG-sziget predikciót végeztünk (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) [181]. A biszulfít-specifikus PCR (BS-PCR) során olyan primereket terveztünk a PyroMark Assay Design szoftver (SW 2.0, Qiagen, Németország) használatával, amelyek nem a CpG-szigetekre, hanem az azokat körülvevő szekvenciára illeszkednek. Erre azért volt szükség, hogy metilációs állapottól függetlenül szaporíthassuk fel a biszulfít-konvertált DNS szakaszokat. Minden reakcióban az egyik primer biotinált volt. A primerek specificitását *in silico* teszteltük a BiSearch szoftver (<http://bisearch.enzim.hu>) segítségével [178].

A BS-PCR AmpliTaq Gold 360 (2x) mastermixet (Thermo Fisher Scientific), LightCycler 480 ResoLight (40x) festéket (Roche Applied Science), a tervezett primerek keverékét (forward és reverse) 200 nM végkoncentrációban és 10 ng biszulfít konvertált DNS-t tartalmazott 15 µl végtérfogatban. A reakció LightCycler 480 (Roche Applied Science) gépben ment végbe a következő hőprogrammal:

- denaturáció: 95°C 10 min;
- 10 touchdown ciklus: 95°C 30 sec, 60°C 30 sec 0.4°C csökkenéssel ciklusonként, és 72°C 30 sec;
- 40 amplifikációs ciklus: 95°C 30 sec, 56°C 30 sec, és 72°C 30 sec.

A biszulfid konverziót és BS-PCR-t követően a DNS metilációs státusztól függően módosulnak a bázisok a DNS szekvenciában. Azok a citozinok, amelyek nem tartalmaznak metil-csoportot átkonvertálódnak timinné, azok azonban, amelyek metiláltak, citozinok maradnak.

4.3.6. Piroszekvenálás 454 GS Junior készülékkel

A CpG-szigetek bázisonkénti metilációs állapotának meghatározására az egyik legalkalmasabb módszer a direkt biszulfid szekvenálás. A GS Junior készülékkel a 454 technológiát alkalmazva megközelítően 400 nukleotid hosszúságú szakaszokat lehet leolvasni. A rövid ampikon könyvtárkészítéshez és emulziós PCR-hez a „Guidelines for Amplicon Experimental Design” utasításokat követtük. A biszulfid-specifikus PCR-t követően az ampikonok koncentrációját Qubit 1.0 fluoriméterrel (Thermo Fisher Scientific) mértük le a High Sensitivity dsDNA kit segítségével. Az adott mintákhoz tartozó PCR termékek szintézise után (a vizsgált régióknak megfelelően) az ampikonokat ekvimolárisan kevertük össze a könyvtárkészítés során. A PCR termékeket AMPure XP gyöngyökkel (Agencourt, USA) tisztítottuk a gyártó utasításait követve. A termékek minőségi ellenőrzését BioAnalyzer 2100 mikrokapilláris elektroforézissel (Agilent, Santa Clara, USA) végeztük High Sensitivity DNA chipen. A fragmentumok végének javítását (Fragment End Repair) GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kittel (Rapid Library Preparation Method Manual 3.2) hajtottuk végre. A szekvenálás során több minta több ampikonját tudtuk egyszerre vizsgálni, ezért a minták azonosítása céljából az ampikonok végeihez egyedi azonosítót, ún. molekuláris vonalkódot ligáltunk GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Rapid Library Preparation Method Manual 3.4) használatával. Az adatelemzés során ezeknek a mesterséges azonosító szekvenciáknak köszönhetően tudtuk a leolvasott szekvencia-információkat az egyes betegekhez rendelni. A ligálás után a könyvtár tisztítását és minőségi ellenőrzését megismételtük AMPure gyöngyök, illetve a BioAnalyzer készülék segítségével, és a könyvtár mennyiségét ismét meghatároztuk Qubit High Sensitivity dsDNA kittel. A mintákat egyenlő arányban összekevertük, majd

emulziós PCR-t mértünk össze 0,5 molekula/gyöngy aránnyal Lib-L emPCR Kitet használva. A gyöngydúsítást (bead enrichment) és a szekvenálást a GS Junior Titanium Sequencing Kit alkalmazásával végeztük a „Sequencing Method Manual, GS FLX Titanium Series” leírásnak megfelelően. A templát szekvenciákhoz történő illesztés során a JAligner szoftver csomagban Smith-Waterman-Gotoh algoritmust alkalmaztuk [182-184]. Az elemzés során azokkal a szekvenciákkal dolgoztunk, amelyek legalább 80%-ban mutattak egyezést a referenciával.

4.3.7. Methyl capture szekvenálási adatok *in silico* vizsgálata

Kutatócsoportunk által publikált, hipermetilált DNS szakaszok tisztításán alapuló (Methyl capture – MetCap) szekvenálási módszerrel kapott 6 NAT, 15 AD és 9 CRC biopszia minta metilációs eredményeit *in silico* elemeztük [185]. Azokat az eltérően metilált régiókat (differentially methylated region – DMR) vizsgáltuk, amelyek átfednek a piroszekvenálással tanulmányozott szakaszokkal, majd a későbbiekben MethyLight PCR-rel is elemeztett 4 génhez (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) tartozó DNS régiókkal. Meghatároztuk a vizsgált DMR-ek metilációs fokát, azaz β -értékét, majd kiszámoltuk a $\Delta\beta$ -értékeket, amelyek a mintacsoportok közötti átlag metilációs különbségeket jelentik.

4.3.8. Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip adatok *in silico* elemzése

A kiválasztott négy gén metilációs státuszát a teljes promóter szakaszon is megvizsgáltuk. A szöveti mintákhoz tartozó metilációs eredményeket a Rákgenom Atlasz (The Cancer Genome Atlas – TCGA) adatbázisból (<https://genome-cancer.ucsc.edu/proj/site/hgHeatmap/>) és a Gene Expression Omnibus (GEO – GSE48684) webes adatbázisból töltöttük le [186]. A TCGA eredmények 39 vastagbélrákos beteg és 39 párosított NAT szöveti mintáinak, míg a GEO adathalmaz 123 egészséges, adenómás és vastagbélrákos biopszia minta szekvenálási eredményeit tartalmazta. Összesen a 4 vizsgált génhez tartozó 99 CpG hely metilációs státuszát határoztuk meg, amelyből 9 CpG hely esett azokra a szakaszokra, melyeket a későbbiekben a MethyLight próbákkal is vizsgáltunk. Meghatároztuk a CpG helyekhez tartozó β -értékeket, majd a mintacsoportok közötti átlag metilációs különbségeket ($\Delta\beta$ -érték).

4.3.9. Immunhisztokémiai elemzések

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a DNS metiláció befolyásolja-e a kiválasztott négy marker fehérje termékeinek expresszióját, immunhisztokémiai elemzéseket végeztünk. A későbbiekben MethyLight PCR-rel is tanulmányozott biopsziás mintákat (11 egészséges, 11 AD és 10 CRC) formalinnal fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. A minták diagnosztizálása hematoxin-eozin festést követően szakértő patológusok által történt. A deparaffinálást és rehidratálást követően mikrohullámú antigén feltárást végeztünk Tris-EDTA pufferben (pH 9,0) (900 W/10 perc, majd 340 W/40 perc). A minták immunhisztokémiai jelölése anti-SFRP1 (Abcam, ab4193; 1:50), anti-SFRP2 (Sigma-Aldrich, HPA002652; 1:80), anti-SDC2 (Abcam, ab191062; 1:80) és anti-PRIMA1 (Sigma-Aldrich, HPA060047; 1:80) antitestekkel történt, amelyeket diaminobenzidin – hidrogén peroxidáz – kromogén szubsztrát rendszerrel tettünk láthatóvá (HISTOLS-DAB, Histopathology Ltd., 30014.K). A tárgylemezeket Panoramic 250 Flash II digitális szkennelvel archiváltuk (3DHISTECH Kft.), majd Panoramic Viewer (ver.:1.15.3; 3DHISTECH Kft.) szoftver segítségével szemi-kvantitatív módon értékeltük. Az elemzés alapja az ún. Quick-score (Q) módszer, amely során a pozitív sejtek arányát szoroztuk az intenzitásukkal (I: +3 erős, +2 mérsékelt, +1 gyenge festődés, 0 érték esetén nem tapasztaltunk pozitivitást; formula: $Q=P \times I$; maximum=300). A hám és stróma rétegeket elsődlegesen elkülönítve vizsgáltuk, amelyet később összegeztünk (Σ Q-score maximum= 600), hogy összehasonlíthatóvá váljanak a MethyLight próbákkal kapott eredményekkel.

4.3.10. DNS izolálás vastagbél biopszia és plazmamintákból

A MethyLight próbákkal történő metilációs szint meghatározására 11 egészséges, 11 adenómás és 10 CRC-s beteg szöveti mintáiból izoláltunk DNS-t. A minták lízise és emésztése 4 mg/mL proteináz K enzimmel történt 16 órán keresztül 56°C-on, majd a DNS izolálásához a High Pure PCR Template Preparation Kitet (Roche Applied Science) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t 100 µl RNáz- és DNáz-mentes PCR tiszta vízben eluáltuk, majd további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A minták koncentrációját NanoDrop-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg. A plazmamintákból (37 N, 37 AD és 47 CRC) történő szabad DNS kivonását a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche Applied Science) segítségével hajtottuk végre 3,5 ml plazmából. Az eluálást 100 µl elúciós pufferben végeztük, majd az skDNS mennyiségét Qubit 1.0 fluoriméterrel

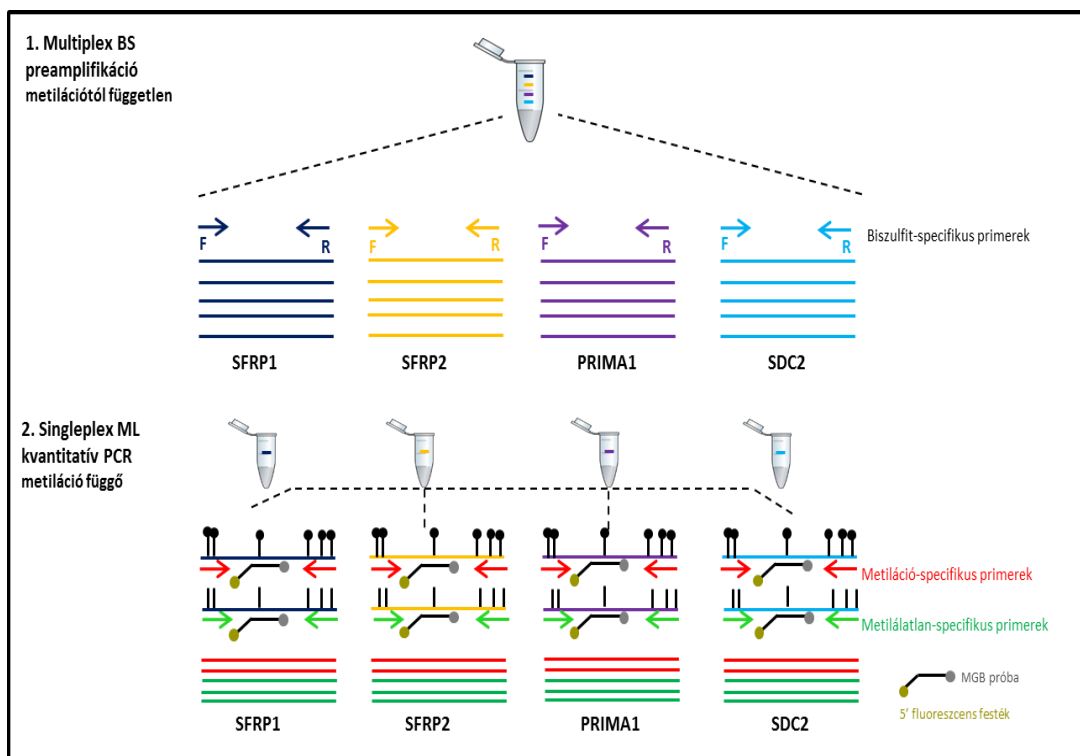
kvantifikáltuk a Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit alkalmazásával (Thermo Fisher Scientific).

4.3.11. Biszulfít konverzió

A szövet- és plazmamintákból izolált DNS-t biszulfít konvertáltuk az EZ DNA Methylation Direct Kit (Zymo Research) használatával a gyártó javaslatait követve. A biszulfít konvertált DNS mintákat 20 µl elúciós pufferrel eluáltuk, majd -80°C-on tároltuk további felhasználásig.

4.3.12. Multiplex biszulfít-specifikus preamplifikáció

A biszulfít konverziót követően egy preamplifikációs lépést végeztünk el, az alacsony mennyiségű szabad DNS miatt és a metilációs státusz elemzés érzékenységének növelése érdekében (11. ábra) [187, 188].



11. ábra. A biszulfít-specifikus preamplifikáció és a MethyLight PCR folyamata. Kétlépéses PCR módszert használtunk a 4 gén metilációjának vizsgálatára. Első lépésként multiplex preamplifikációt alkalmaztunk, amely során a kiválasztott szakaszokat metilációs állapottól függetlenül sokszoroztuk fel. Második lépésként MethyLight kvantitatív PCR-t használtunk nested metiláció-specifikus PCR primerekkel. Rövidítések: BS – biszulfít-specifikus; ML – MethyLight.

A biszulfid-specifikus (BS) primerek tervezését a PyroMark Assay Design 2.0 szoftver (Qiagen) segítségével végeztük. A szoftverrel olyan próbákat terveztünk a 4 gén promóter régiójára, amelyek a vizsgálni kívánt szakaszon kívül, nem CpG régiókon helyezkednek el (8. táblázat). Erre azért volt szükség, hogy a primerek metilációs állapottól függetlenül, minden biszulfid konvertált DNS szakaszt felszorzozzanak (9. táblázat). A primerek *in silico* tesztelése a BiSearch szoftverrel (<http://bisearch.enzim.hu>) történt [178].

8. táblázat. A preamplifikáció és a MethyLight PCR során vizsgált szakaszok pozíciója. (Humán referencia genom: GRCh38/hg38).

Gén szimbólum	Génnév	A preamplifikált PCR termékek pozíciója	MethyLight PCR termékek pozíciója
SFRP1	Szekretált frizzled-rokon fehérje 1	chr8:41,308,621-41,308,834	chr8:41,308,713-41,308,777
SFRP2	Szekretált frizzled-rokon fehérje 2	chr4:153,789,139-153,789,497	chr4:153,789,264-153,789,386
SDC2	Szindekán-2	chr8:96,494,020-96,494,321	chr8:96,494,022-96,494,170
PRIMA1	Prolin-gazdag membrán horgony 1	chr14:93,788,793-93,789,014	chr14:93,788,894-93,788,993

A BS-PCR 15 µl Multiplex PCR Master Mixet (2x) (Qiagen), a négy BS primer (egyenként 10 µM) keverékét 200 nM végkoncentrációban és 10 ng konvertált DNS mintát tartalmazott. A reakcióhoz Mastercycler ep Gradient S gépet (Eppendorf) használtunk. Az amplifikáció során a következő hőciklusokat alkalmaztuk:

- denaturáció: 95°C 15 min;
- 8 touchdown ciklus: 95°C 30 sec, 60°C 2 perc 0.5°C csökkenéssel ciklusonként, és 72°C 30 sec;
- 27 amplifikációs ciklus: 95°C 30 sec, 56°C 2 perc, és 72°C 30 sec.

A termékek ellenőrzését 2%-os agaróz gélen gélelektroforézissal végeztük. A preamplifikáció után a mintákat 1:10.000 arányban hígítottuk RNáz- és DNáz-mentes PCR tiszta desztillált vízzel, majd -20°C-on tároltuk azokat. A metilációs státusz mennyiségi meghatározása céljából EpiTect (Qiagen) 100%-ban metilált (M) és 100%-ban nem-metilált (UM) kontroll DNS-t is amplifikáltunk a mintáinkkal párhuzamosan a

fent említett módon. A metilált és nem-metilált DNS mintákból 10 ng-os keverékeket készítettünk a következő arányokban: 100% M; 50% M-50% UM; 25% M-75% UM; 10% M-90% UM; 5% M-95% UM; 2.5% M-97.5% UM; 100% UM.

9. táblázat. A primerek és TaqMan próbák szekvenciái. Rövidítések: BSP – biszulfite-specifikus primerek; MLP – MethyLight primerek; F – forward; R – reverse; M – metilált; UM – nem-metilált; TAQ – TaqMan próba; MGB – minor groove binder; FAM – 6-fluorescein amidite; VIC – 4,7,2-trichloro-7-phenyl-6-carboxyfluorescein.

Gén szimbólum	Primer szimbólum	Primer szekvencia (5'-3')		
SFRP1	BSP F	GGTTTGGAGGTTTCGGTGGTATTG		
	BSP R	CCAAATCTTCCTCTACTCGCTCTTC		
	ML M F	GAAGTCGAAGAATTGTATGATC		
	ML M R	CGTATCGCTAACTCTACGAA		
	ML UM F	GTAGAAGTTGAAGAATTGTATGATT		
	ML UM R	ACCCATATCACTAACTCTACAAA		
SFRP2	BSP F	GGGAGGAGTTAATGAAGGGTAAT		
	BSP R	ACTCATACCTAACAACCCAACAAAA		
	ML M F	GTCGTCGTTTCGTTTCGTTTAGG		
	ML M R	CGCGAAATACCCTACGTACCC		
	ML UM F	AGATGTTGTTGTTTGTGTTTAGG		
	ML UM R	CCACTCACAAAATACCCTACATACCC		
SDC2	BSP F	TGTCGGGAGTGTAGAAATTAATAAGTGAGAG		
	BSP R	ACACGCAAACCACCAACCCAATA		
	ML M F	TCGGGAGTGTAGAAATTAATAAG		
	ML M R	AAAATACCGCAACGATTACG		
	ML UM F	GGGAGTGTAGAAATTAATAAG		
	ML UM R	AATACCACAACAATTACAAC		
PRIMA1	BSP F	AGGTAGAGGGCGGGAAAGTTT		
	BSP R	CCTCCACCCACGACTTTACTACCC		
	ML M F	CGGTTGTTTCGGGGTATTGG		
	ML M R	CCCAACGAAAACCTCCCTACC		
	ML UM F	TGGTGTGTTGTTGTTGTTGG		
	ML UM R	CACGACTTTACTACCCAACA		
Gén szimbólum	TaqMan próba szimbólum	TaqMan próba szekvencia (5'-3')	5' Riporter	3' Quencher
SFRP1	ML M TAQ	TTCGTACGAGTCGCGTACGG	FAM	MGB
	ML UM TAQ	GTTTGTATGAGTTGTGTATGG	VIC	MGB
SFRP2	ML M TAQ	TCCCGCAACCCGCGCCCTACT	FAM	MGB
	ML UM TAQ	TCCCACAACCCACACCCTACTACTC	VIC	MGB
SDC2	ML M TAQ	GTCGCTTCTCCTCTACGC	FAM	MGB
	ML UM TAQ	ACTCACTTCTCCTCTACAC	VIC	MGB
PRIMA1	ML M TAQ	CCGCCGCTACCTCTCGC	FAM	MGB
	ML UM TAQ	CTACCAACACCTCCCACTACTCTC	VIC	MGB

4.3.13. MethyLight polimeráz láncreakció

A MethyLight PCR technika során a biszulfid konverzió után bekövetkezett metilációtól függő szekvencia különbségeket tudtuk kimutatni. A folyamat során olyan primereket és TaqMan próbákat terveztünk a Primer Express 3.0.1. (ThermoFisher Scientific) program segítségével, amelyek azokra a CpG helyekre specifikusak, amelyeknek a metilációs státuszára kíváncsiak voltunk (11. ábra, 9. táblázat). A reakció 5 µl hígított preamplifikált DNS templátot, 10 µl LightCycler® 480 Probes Master (2x) mixet (Roche Applied Science), 1,8 µl primert (10 µM) és 0,5 µl MGB TaqMan próbát (ThermoFisher Scientific) 250 nM végkoncentrációban tartalmazott. A folyamatot LightCycler 480 műszerben (Roche Applied Science) végeztük 96 lyukú plate-ekben. Minden plate tartalmazott negatív kontrollt, a különböző arányban metilált és nem-metilált DNS-t tartalmazó kontroll sor tagjait, és a mintákat duplikátumokban. A PCR hőciklusai a következőképpen alakultak:

- denaturáció: 95°C 10 min;
- 40 amplifikációs ciklus: 95°C 15 sec, 55°C/60°C 1 min, 72°C 30 sec;
- hűtés: 40°C 30 sec.

Az annelációs hőmérséklet előzetes méréseink alapján az *SFRP1* és az *SDC2* gének esetében 55°C volt, az *SFRP2* és a *PRIMA1* esetében pedig 60°C.

A minták metilációs szintjének meghatározása a metilált és nem-metilált DNS-t tartalmazó kontrollok áttörési pontja (Ct-érték) alapján számolt egyenlet szerint történt. Azokat a mintákat tekintettük metilátnak, amelyek Ct-értéke a 0%-ban és 100%-ban metilált standard minták Ct-értéke között helyezkedett el.

4.3.14. Alkalmazott statisztikai módszerek

A piroszekvenálással kapott eredmények ábrázolásához R 3.3.1 hőtérképet használtunk, amely az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* génekhez tartozó, kiválasztott CpG helyek metilációs szintjét szemlélteti ép, adenóma és CRC szövetmintákban. A MethyLight PCR-rel vizsgált plazma- és szövetminták metilációjának mértékét a hígítási sor alapján lineáris korreláció (Pearson-féle korreláció) statisztikai megközelítéssel tudtuk megállapítani markerenként. A Receiver Operating Characteristic (ROC) analízis céljából Medcalc 17.1 szoftvert használtunk. A 4 marker

szenzitivitás és specificitás értékeit külön-külön és együttesen, panelként is meghatároztuk többváltozós logisztikus regressziós egyenlettel.

A szekvenálási adatok *in silico* vizsgálata során páros összehasonlítást végeztünk (AD vs. NAT/N, CRC vs. NAT/N és CRC vs. AD) Student-féle t-teszt alkalmazásával, amelynek során a szignifikancia küszöb $p < 0,05$ volt. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a különböző mintacsoportok Q-score eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével értékeltük. Mivel mind a négy marker esetében normál eloszlást tapasztalunk, ANOVA és Tukey-Kramer post-hoc tesztek alkalmaztunk ($p < 0,05$).

4.4. Különböző DNS izolálási módszerek hatásának elemzése a DNS metilációs mintázatra

4.4.1. Betegek és minták

A Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinikáján 139 vérmintát gyűjtöttünk, miután a páciensek rutin kolonoszkópiás vizsgálaton estek át (10. táblázat). A vérével előtt a betegek írásos beleegyező nyilatkozatban járultak hozzá a mintáik kutatási célra történő felhasználására. A tanulmányunkat a hatályos helyi etikai bizottság jóváhagyásával végeztük (Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság; TUKEB sz.: 116/2008).

10. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek adatai. Rövidítések: T – tubuláris; TV – tubulovillózus; CRC – vastagbélrák; N/A – nincs adat.

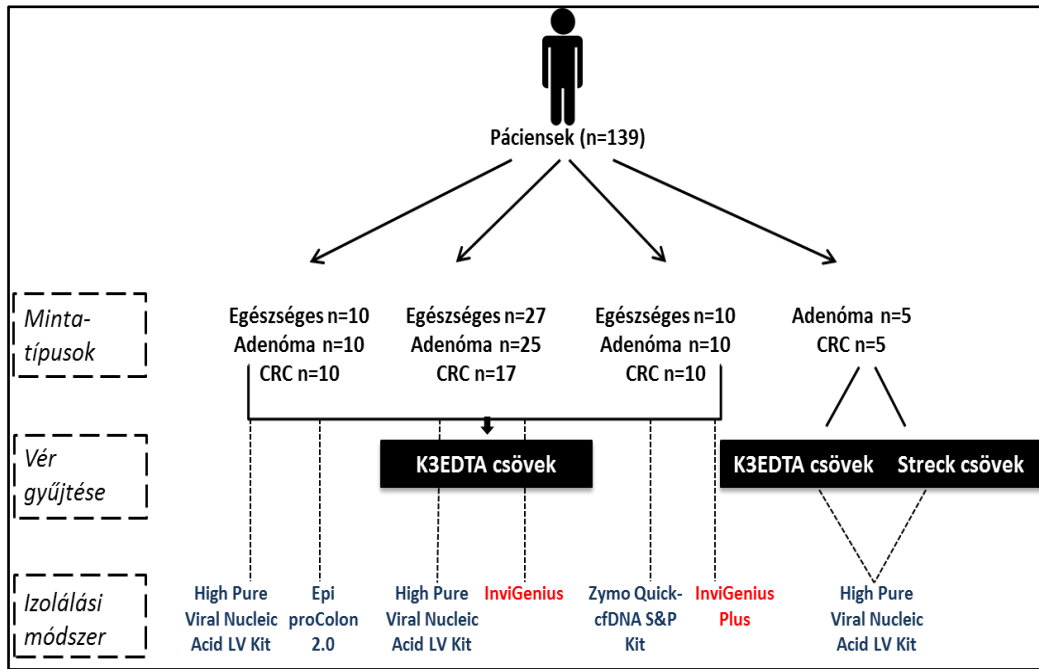
Változók	Egészséges	Adenóma			CRC	
		T	TV	N/A	Dukes A/B	Dukes C/D
<i>Mintaszám</i>	47	20	11	19	27	15
<i>Átlagéletkor</i>	57	65	66	63	69	70
<i>Nem arány (Ffi/Nő)</i>	19/28	10/10	6/5	12/7	8/19	11/4

Öt adenóma és öt CRC vérmintát Cell-Free DNA BCT® (Streck, Németország) gyűjtőcsőbe [189] vettünk le, és 48 órán át szobahőmérsékleten tároltuk a plazma frakció szeparálása előtt. A többi vérmintát K3EDTA (Greiner Bio-One GmbH) csövekbe gyűjtöttük és a plazmát 4 órán belül elválasztottuk. A plazmák szeparálása

1350 rcf fordulattal 12 percig szobahőmérsékleten ment végbe, majd a felülúszó új csőbe mérése után megismételtük a centrifugálást ugyanezekkel a paraméterekkel. Minden plazmamintát további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.4.2. Szabad DNS izolálási és biszulfít-konverziós módszerek

Három különböző kézi és kétféle automata skDNS izolálási módszert vetettünk össze (12. ábra). Első lépésként két manuális izolálási technikát teszteltünk, a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kitet (HP) (Roche Applied Science) és az Epi proColon 2.0 Kitet (EpC) (Epigenomics AG). Az Epi proColon 2.0 az első kereskedelmi forgalomban kapható vérteszt, amely a vastagbélrák előszűrésére alkalmas a *SEPT9* gén metilációjának meghatározása alapján, és tartalmaz skDNS izolálásra és biszulfít konverzióra alkalmas reagenseket. Ezt az összehasonlítást 10 egészséges, 10 adenóma és 10 CRC plazmamintán végeztük. Következő lépésként összevetettük a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit és az automata DNS izoláló InviGenius (I) (STRATEC Biomedical AG) készülék skDNS kihozatalát, amelyet szintén az Epi proColon 2.0 kit reagenseivel használtunk. A tesztelésbe 27 egészséges, 25 AD-s és 17 CRC-s páciens plazmamintáit vontuk be. A fenti mintákból meghatároztuk a carcinoembrionális antigen (CEA) és a citokeratin 19 fragmentum (CYFRA 21–1) tumor markerek mennyiségét is [190, 191] *in vitro* vizsgálattal a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában 500 µl plazmából. Teszteltük továbbá a kézi Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kitet (*QcD*) (Zymo Research) összevetve az InviGenius PLUS (*IP*) (STRATEC Biomedical AG) gépi izoláló módszerrel, amelyen az InviMag Free Circulating DNA Kitet (STRATEC Biomedical AG) alkalmaztuk 10 N, 10 AD és 10 CRC plazmamintán. Végezetül kipróbáltuk a Cell-Free DNA BCT® csöveket összevetve a K3EDTA csövekkel 5-5 adenóma és CRC mintán, amelyekből a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit segítségével izoláltunk DNS-t. A DNS izolálást minden módszer esetén a gyártói protokollokat követve végeztük. A Streck csövek esetén a 70°C-on történő proteináz K emésztési idejét 1 órára növeltük a gyártó utasításainak megfelelően.



12. ábra. Kísérleti elrendezés, mintatípusok. Rövidítések: CRC – vastagbélrák.

A kiindulási plazma mennyisége 3,5 ml volt, kivéve a Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit és az InviMag Free Circulating DNA Kit összehasonlítás esetén, ahol a gyártó utasításainak megfelelően 4 ml plazmából izoláltuk a DNS-t. A DNS eluálása 100 µl RNáz- és DNáz-mentes PCR tiszta desztillált vízben történt. Az skDNS kvantifikálására Qubit 1.0 fluorimétert használtunk Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit segítségével. A Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kittel és High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kittel történt DNS izolálást követően a biszulfít konverzióra az EZ DNA Methylation Direct Kitet alkalmaztuk a gyártó utasításait követve. A biszulfít konvertált DNS mintákat kisebb mennyiségekre szétosztva -80°C-on tároltuk további felhasználásig.

4.4.3. Multiplex preamplifikáció és MethyLight PCR

A biszulfít konverziót követően minden mintát biszulfít-specifikus preamplifikációnak vetettük alá, majd MethyLight PCR elemzést végeztünk azért, hogy meghatározzuk az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* promótereinek metilációs állapotát. A gépi izolálást követően az eluált biszulfít konvertált DNS térfogata változó volt, ezért a különböző mennyiségeket 15 µl-re koncentráltuk Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf AG) segítségével. A preamplifikáció végtérfogata 30 µl volt, amely tartalmazta a Multiplex PCR Master Mixet (2x); a négy biszulfít-specifikus primer (egyenként 10 µM) keverékét, és a konvertált DNS mintákat. A metilált és nem-metilált

kontroll minták párhuzamosan kerültek amplifikálásra. A PCR után a mintákat 1:10.000 arányban hígítottuk RNáz- és DNáz-mentes desztillált vízzel, majd -20°C-on tároltuk felhasználásig. A MethyLight PCR során 5 µl hígított DNS mintát használtunk, továbbá a reakció 10 µl LightCycler® 480 Probes Master Mixet (2x); 1,8 µl primert (10 µM) és 0,5 µl MGB TaqMan próbát 250 nM végső koncentrációban tartalmazott. A preamplifikáció és MethyLight PCR folyamatok részletes leírása a 4.3.11. és 4.3.12. fejezetben található.

4.4.4. Statisztikai elemzések

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációs szintjét, az alkalmazott kontrollok segítségével a MethyLight PCR-t követően lineáris regressziót alkalmaztunk minden marker esetében. Páros összehasonlításokat végeztünk (AD vs. N, CRC vs. N és CRC vs. AD) Student-féle t-tesztet használva, a szignifikáns eltérés kritériuma $p < 0,05$ volt.

4.5. A Septin 9 gén metilációjának összevetése az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének metilációs szintjével

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy az ismert, vastagbélrákra specifikus *SEPT9* metilációs marker különböző izolálási módszereket használva is megbízhatóan jelzi-e a CRC jelenlétét. Továbbá összevetettük a teszt szenzitivitását az általunk vizsgált *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* géneket tartalmazó metilációs panel érzékenységével.

4.5.1. Betegek és minták

A kísérlet során 10 egészséges, 10 adenómás (szövettanilag 5 tubuláris és 5 tubulovillózus) és 20 CRC-s beteg vér mintáit gyűjtöttük össze K3EDTA vérvételi csövekben a páciensek könyökvénájából (11. táblázat).

11. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek adatai. Rövidítések: T – tubuláris; TV – tubulovillózus; CRC – vastagbélrák.

Változók	Egészséges	Adenóma		CRC	
		T	TV	Dukes A/B	Dukes C/D
<i>Mintaszám</i>	10	5	5	12	8
<i>Átlagéletkor</i>	59	58	72	67	69
<i>Nem arány (Ffi/Nő)</i>	1/9	3/2	3/2	5/7	6/2

A vizsgálatunkat a hatályos helyi etikai bizottság beleegyezésével végeztük (Regionális, Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság; TUKEB sz.: 116/2008). A plazma frakciót két körös centrifugálással szeparáltuk 1350 rcf 10 percig szobahőmérsékleten a vérvételt követő 4 órán belül. A plazmákat -20°C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

4.5.2. DNS izolálás és biszulfít konverzió

A plazmákból három különböző módszerrel izoláltunk szabad DNS-t: High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kittel (HP), Epi proColon 2.0 (EpC) manuális módszerrel és az InviGenius (I) automatával. Mind a három metódus esetében a kiindulási plazma mennyisége 3,5 ml volt. A DNS kinyerését a gyártók utasításainak megfelelően végeztük. Az EpC kit része az Epi proColon Plasma Quick Kit (Epigenomics AG), amellyel a DNS izolálását és biszulfít konverzióját lehet elvégezni mind a kézi, mind az InviGenius automatán történő izolálás során is. A plazmaminták mellett ún. külső kontrollokat is izoláltunk, amelyek a SEPT9 metilációra nézve pozitívak vagy negatívak (Epi proColon Control Kit, Epigenomics AG). A HP kit használata után a biszulfít konverzióra az EZ DNA Methylation Direct Kitet használtuk a gyártó utasításait követve.

4.5.3. Kvantitatív PCR

A SEPT9 gén metilációs állapotát az Epi proColon Sensitive PCR Kit (Epigenomics AG) segítségével mértük, ami kétirányú (duplex) PCR vizsgálatot tartalmaz. Az elemzéssel a biszulfít konverziót követően a SEPT9 gén v2 régiójában található metilált CpG-sziget meghatározott részeit tudjuk detektálni, valamint a β -aktin (ACTB) gén adott szakaszát is, amelyből következtetni lehet a teljes konvertált DNS állomány mennyiségére. A PCR a metilált SEPT9-re (*mSEPT9*) specifikus fluoreszcens detekciós

próbákat és a nem-metilált szakaszokra specifikus blokkolókat tartalmaz, ezért csak a metilált szakaszok amplifikációja történik meg. A reakcióhoz LightCycler 480 (Roche Applied Science) készüléket alkalmaztunk a következő hőciklust használva:

- enzim aktiváció: 94°C 20 min;
- 50 amplifikációs ciklus: 93°C 30 sec, 56°C 35 sec, 62°C 5 sec;
- hűtés: 40°C 30 sec.

A PCR során a metiláció mértékére a Ct-értékekből következtettünk kalibrációs görbe segítségével, amelyhez biszulfít konvertált metilált kontroll DNS-t (EpiTect bisulfite converted, fully methylated control DNA; Qiagen) alkalmaztunk 30, 15, 5, 2, és 0,8 ng/PCR hígításokban.

4.5.4. Statisztikai értékelés

Az eredmények kiértékeléséhez detektálási határokat (Ct-értékek) használtunk a gyártó utasításait követve. Minden mintát három ismétlésben vizsgáltunk. Egy mintában akkor tekintettünk a SEPT9-et metiláltnak, ha legalább két reakcióban a detektálási határon belülre estek a Ct-értékek (SEPT9 Ct<50; ACTB Ct≤33,7). Továbbá egy PCR-t érvénytelennek minősítettünk, ha a pozitív vagy negatív kontrollok bármelyikének Ct-értéke a detektálási tartományon kívül esett (12. táblázat).

12. táblázat. Az RT-PCR detektálási határai.

Mintatípus	PCR futás	SEPT9 Ct	ACTB Ct	Eredmény
Pozitív kontroll	3/3	≤ 40,5	≤ 30,3	Érvényes
Negatív kontroll	3/3	-	≤ 37,1	Érvényes
Plazmaminta	2/3 vagy 3/3	< 50	≤ 33,7	SEPT9 pozitív
	2/3 vagy 3/3	-	≤ 33,7	SEPT9 negatív
	2/3 vagy 3/3	Bármely Ct	> 33,7	Érvénytelen

Az *ACTB* génhez tartozó Ct-értékekből következtettünk a szabad DNS mennyiségére, és a három izolálási módszerrel kapott eredményeket összehasonlítottuk.

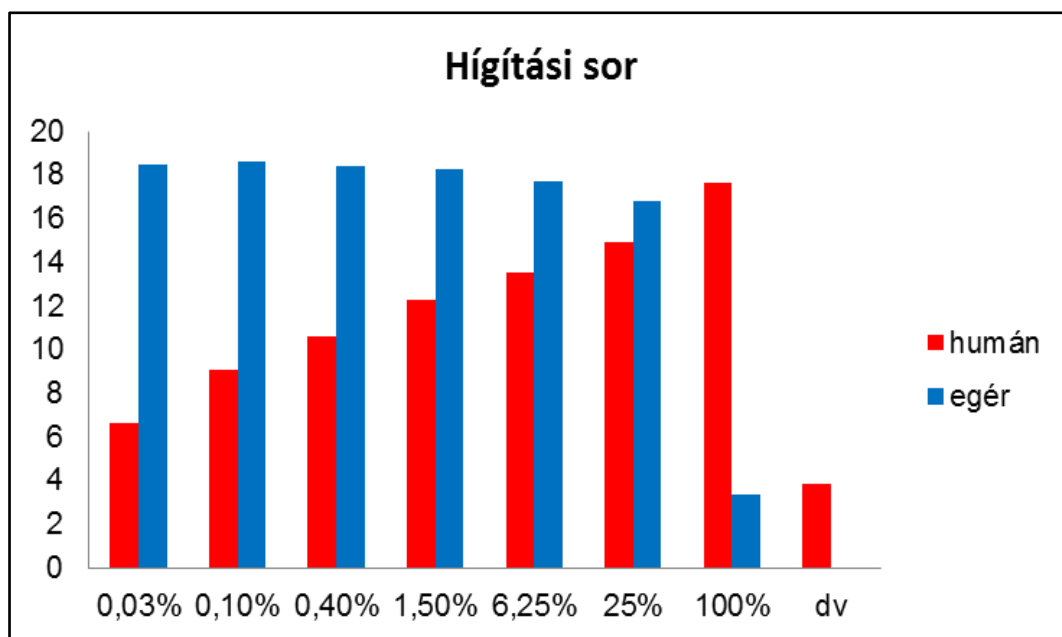
A PCR elvégzése után meghatároztuk a szenzitivitás és specificitás értékeit, majd összevetettük az 5.2.6. fejezetben tapasztalt eredményeinkkel, amelyben az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* metilációját vizsgáltuk egészséges, adenómás és CRC betegektől származó plazmamintákban.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Szabad DNS vizsgálata állatmodellek használatával

5.1.1. A szabad DNS felszabadulásának elemzése

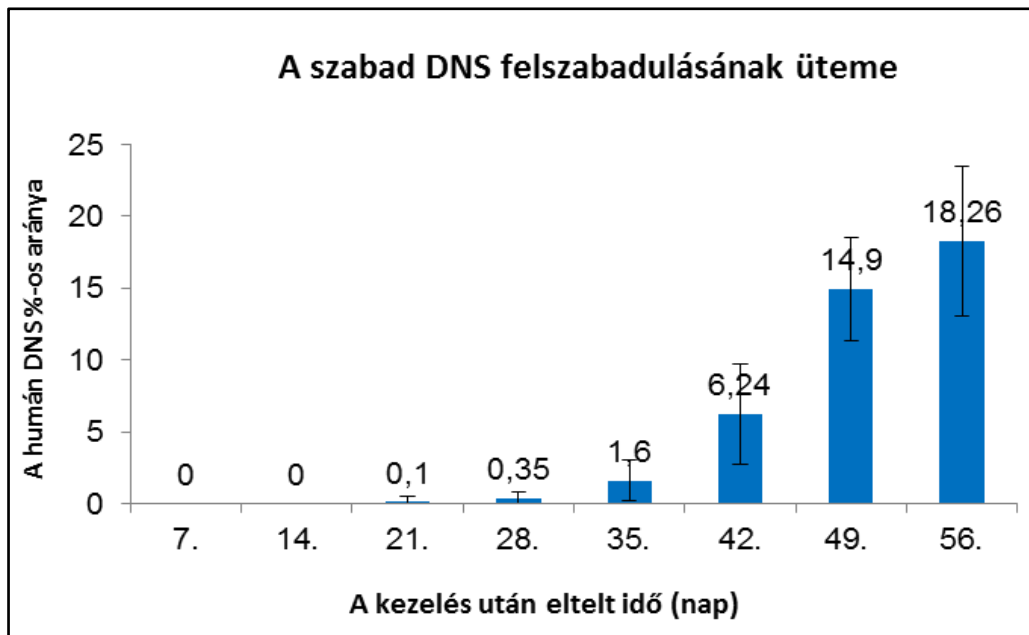
A szabad DNS tumorszövetből történő felszabadulásának ütemét egér-humán xenograft modell segítségével vizsgáltuk. Az egér és a humán genom között igen nagyfokú a hasonlóság (70-80%-os), ami jelentősen megnehezítette a mennyiségi elemzést, mivel magas egér DNS „háttérben” kellett azonosítani, elkülöníteni és kimutatni a nagyságrendekkel kisebb kópiaszámban megjelenő és jelen lévő, tumorból származó humán HT-29 eredetű skDNS-t. Ehhez valós idejű PCR alapú megközelítést alkalmaztunk magas érzékenysége és specifikussága miatt. A vizsgálat során 6 egér és 6 humán mitokondriális (4-4) és genomiális (2-2) primerek alkalmazásával szaporítottuk fel és mutattuk ki a meghatározott régiókat. A gének kiválasztása többszörös szekvencia illesztés után történt, amely során olyan régiókat kerestünk, amelyek specifikusan vagy csak a humán, vagy csak az egér DNS-ben találhatóak. Az egér-humán DNS hígítási soron történő tesztelések azonban azt mutatták, hogy a magas hasonlóság miatt keresztreakciók adódnak. Ezért kizárólag azokat a primer-kombinációkat tartottuk meg, amelyek működését a másik faj DNS-e nem befolyásolta. A módszer érzékenységét egy 7 tagból álló hígítási sor segítségével állapítottuk meg. A DNS mintákat 1 µg/ml-es végkoncentrációjára hígítottuk, mivel előzetes kísérleteink szerint a plazma DNS koncentrációja jellemzően ebbe a tartományba esik. Ezután felállítottuk a hígítási sort a 4. táblázat szerint, majd a PCR során kapott áttörési pontokat elemeztük. Ezeket az értékeket a maximum ciklusszámból (50) levonva ábrázoltuk azért, hogy a kapott értékek arányosak legyenek a kópiaszámmal (13. ábra).



13. ábra. A sejten kívüli DNS felszabadulására vonatkozó kísérletben használt hígítási sor elegyítési aránya. A végkoncentráció 1 µg/ml volt. A módszer érzékenységét tekintve képes az egér plazmamintákban 1%-os humán DNS tartalmat is kimutatni. Rövidítések: dv – desztillált víz.

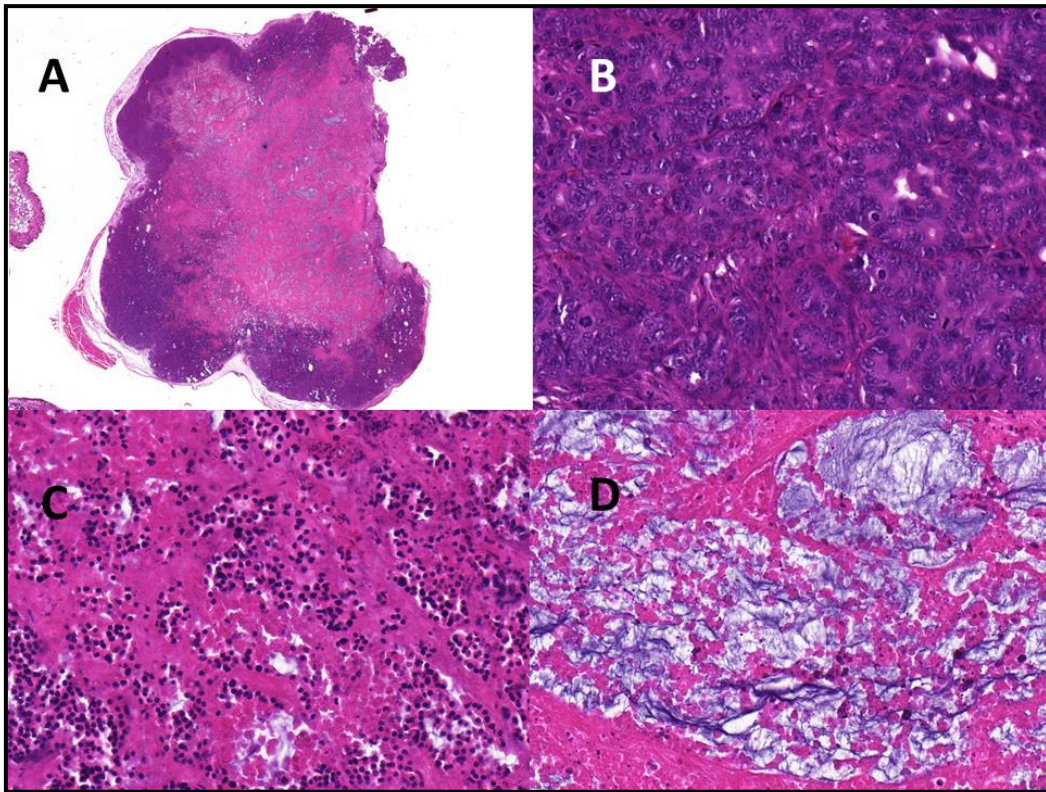
Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a módszer olyan érzékenységgű, hogy nagy biztonsággal képes kimutatni 1%-os humán DNS tartalmat az egér plazmamintákból. Minden mintát a genomiális DNS mért értékével normalizáltunk, majd a kalibrációs pontokra illesztett egyenesek egyenletével meghatároztuk a humán DNS tartalmat, amelyet minden mintára átlagoltunk. Az átlag értékeket ezután a szórás értékek feltüntetésével ábráztuk. A plazmában található DNS mennyiségekkel történő korrekciót követően kapott eredményeket a 14. ábra szemlélteti.

A HT-29 sejtek egerekre történő oltása után a humán skDNS tartalom az első 2 hétben a kimutathatósági határ alatt volt, a 3. hét végére viszont elérte a 0,1%-os arányt. A következő napokban folyamatos emelkedést tapasztaltunk, az 56. napra a humán DNS aránya elérte a 18,26%-ot, ami azt jelenti, hogy a véráramban található szabad DNS közel 1/5-e a humán daganatsejtekből származott. Ez tömegarányosnak tekinthető, hiszen az állatok feláldozásakor a tumor tömege az állatok össztömegének megközelítőleg 20%-át tette ki.



14. ábra. HT-29 tumorsejtekből származó humán skDNS megjelenésének százalékos arányának átlaga. Az SHO egerekre oltott humán tumorból származó DNS a 8. hétre átlagosan 18,26%-ra emelkedett.

A daganatból készült metszetek hematoxilin-eozin festését követően a digitalizálást virtuális mikroszkóppal végeztük, a vizualizálás Panoramic Viewer Software segítségével történt (15. ábra). Amint a 15. ábrán látható, az osztódó daganatsejtek a tumorszövet perifériáján helyezkedtek el, a tumor közepe felé azonban a sejtek pusztulást mutatnak.



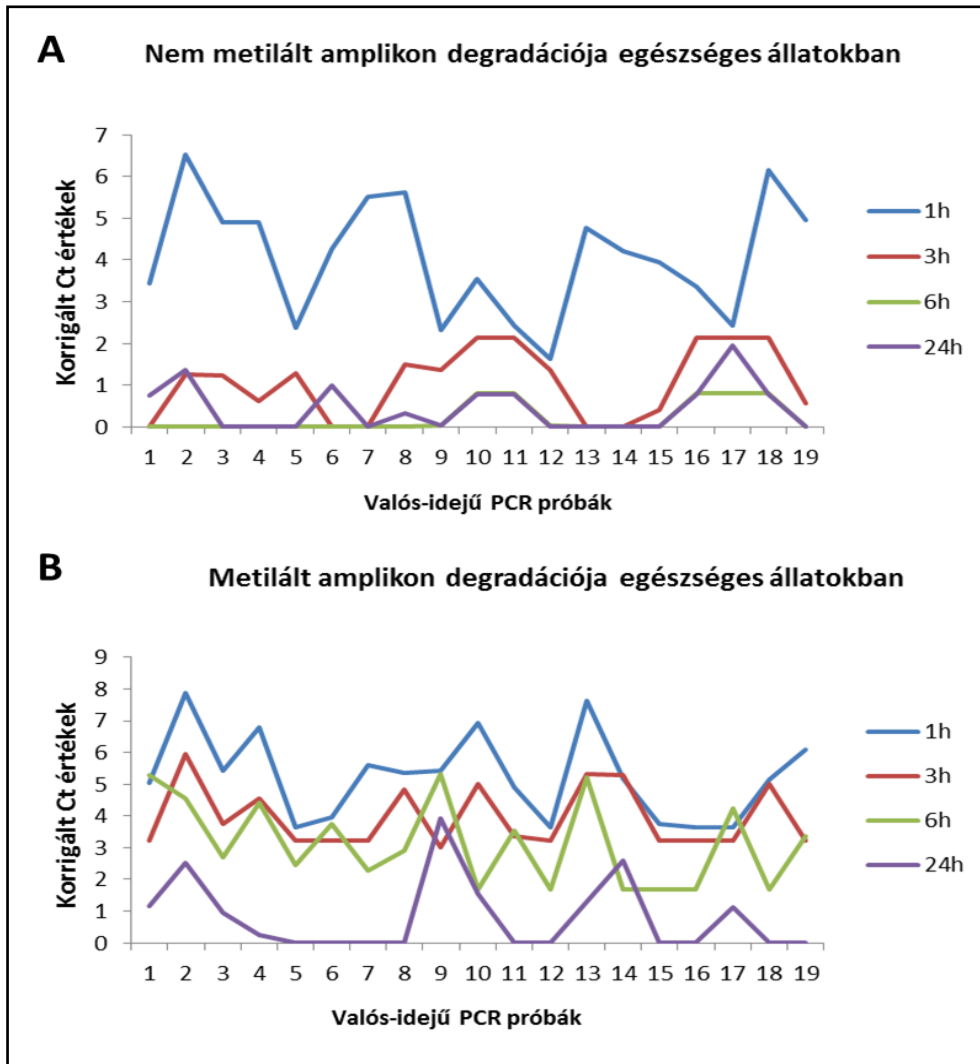
15. ábra. A xenograft-modellből származó tumor szövettani metszete hematoxilin-eozin festéssel. A teljes tumorszövet 5x nagyításban látható (A). A metszet külső régiójában az élő és osztódó tumorsejtek sötétén festődnek, míg a középső régióban az elhaló és nekrotizált sejtek, sejtmaradványok világos festődést mutatnak. Életképes, osztódó HT-29 tumorsejtek a tumorszövet hajszálerekkel gazdagon ellátott bőr alatti régiójában (B). Átmeneti régió, elhaló tumorsejtek erősen festődő kompakt sejtmagokkal (C). A nekrotikus területről származó elhalt szöveti rész (D). A B-D ábrák 20x nagyításban láthatóak.

5.1.2. A sejten kívüli DNS lebomlásának vizsgálata

A HT-29 sejtekből izolált DNS templátról a GAPDH génen elhelyezkedő 3000bp méretű szakaszt fölszaporítottuk a GDH_X1 jelölésű primer alkalmazásával, ezután a PCR terméket tisztítottuk, majd a kapott minta egy részét *in vitro* metilálás után, a másik részét metilálás nélkül injektáltuk az egerek farokvénájába. Mindezek után az állatokból vért vettünk 5 időpontban és a plazma frakcióból DNS-t izoláltunk. A plazmaminták DNS tartalmának pontos meghatározásához 5 egér kromoszóma szakaszt használtunk (eIL6, eTNF α , eTLR5, eTLR9, e18S), amelyekre tervezett primerekről korábbi ellenőrzések során bebizonyosodott, hogy a humán DNS-t nem képesek felszaporítani. Ennek segítségével meghatároztuk a minták DNS koncentrációját, majd

az elemzés során a mért ciklusértékekkel korrigáltunk, vagyis ha az 5 DNS szakaszon mért ciklusértékek átlaga 1 ciklussal tért el, a két minta közötti különbséget kétszeresnek vettük.

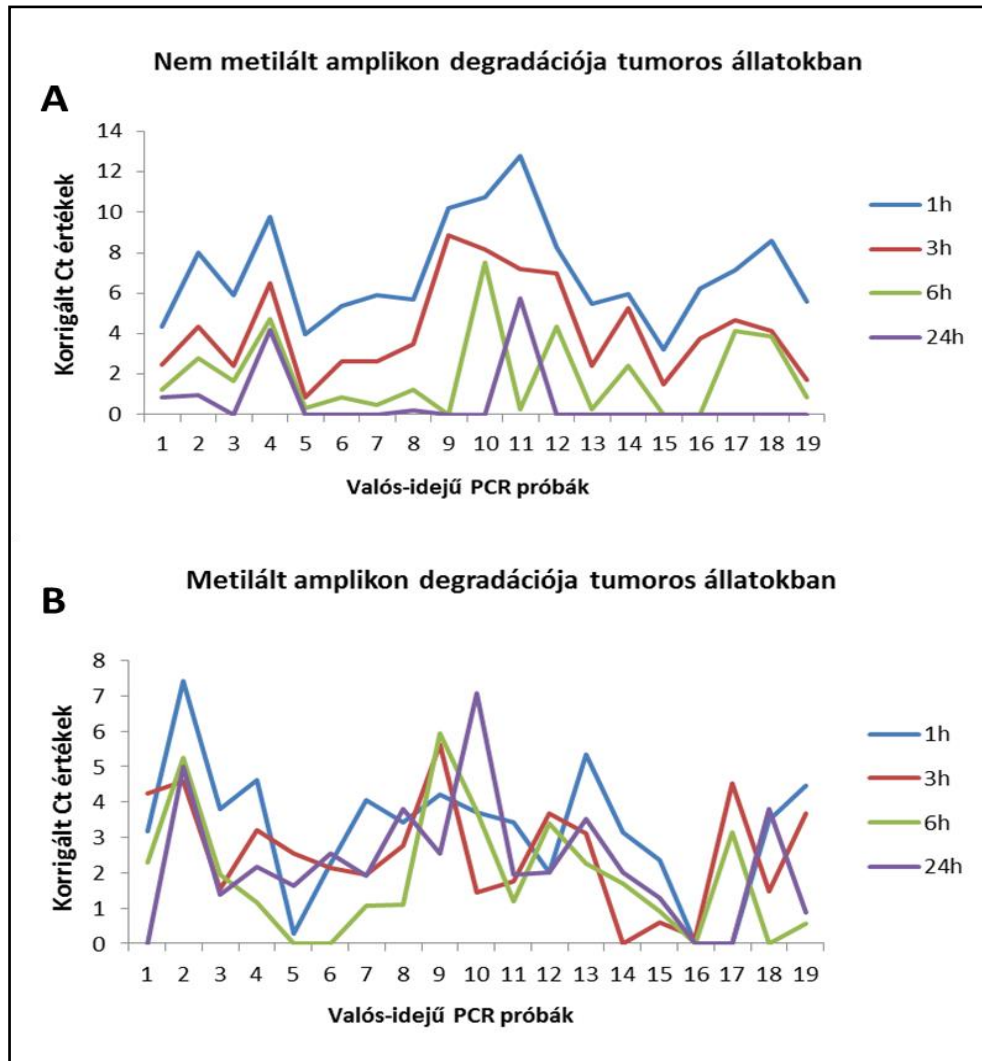
A kísérlet folyamán a 19 primer-pár (5. táblázat) validálása céljából a tisztított PCR termékből egy 4 tagból álló hígítási sort készítettünk. Az értékelés folyamán kiszámoltuk az R2 korrelációs koefficiens, ami 0,9 és 1 közé esett. A reakciók hatásfokai $E=81,86 - 112,75\%$ között adódtak, az $E=10(-1/m)-1$ képletet felhasználva, ahol E =hatásfok, m =meredekség ($m=(-3,07) - (-3,86)$). Az egyes szakaszok között csekély különbséget tapasztaltunk, ami annak köszönhető, hogy a primerek tapadási környezete minimális mértékben eltérhet energetikai szempontból, így a 60°C -ra tervezett assay-k kissé eltérő áttörési pontokat adtak. Az eredmények azonban abba az értéktartományba estek, amelyek megerősítették, hogy a primerek alkalmasak a kvantifikálásra. A valós idejű PCR végeredményeként megkapott duplikátumok áttörési pontjait átlagoltuk, majd ezeket kivontuk az összesen végrehajtott ciklusok számából (50) azért, hogy a kapott értékek arányosak legyenek a kiindulási DNS koncentrációval. Következő lépésként a nulladik időponthoz normalizáltuk az értékeket, azaz a kezelés előtti vérmintákból izolált DNS Ct-értékeiből levontunk az előzőleg megkapott számokat. Utolsó lépésként korrigáltunk a minták közötti koncentráció különbségekkel is. A 4 vizsgált esetet – egészséges állat: nem-metilált, metilált humán DNS-szakasz (16. ábra); tumoros állat: nem-metilált, metilált humán DNS-szakasz (17. ábra) – grafikonokon szemléltettük.



16. ábra. Egészséges állatokba injektált humán nem-metilált (A) és metilált (B) ampliconok degradációjának üteme. A metilált fragmentumok stabilabbnak mutatkoztak.

Az egerek véráramába injektált nem-metilált és metilált DNS szakaszok lebomlási sebessége eltért. Ha összevetjük az egészséges egerekből származó mintákban a bejuttatott humán DNS bomlásának ütemét, láthatjuk, hogy a nem-metilált minták esetében 1 óra elteltével a vizsgált humán DNS szakaszok nagy koncentrációban kimutathatók. A 3 órás mintákban nagyfokú degradációt figyelhetünk meg, ami a 6 órás mintákban tovább fokozódik, a 24 órás mintáknál pedig már olyan mértékű, hogy a kimutathatósági határ alá csökken a fragmentumok jelenléte. A mesterségesen metilált DNS minta sokkal stabilabbnak mutatkozott, mivel a 3 és 6 órás mintákból is viszonylag nagy mennyiségben kimutatható a humán amplicon. A degradáció 24 óra

alatt itt is bekövetkezik, azonban a 3000bp-os molekula bizonyos fragmentumai még detektálhatóak.



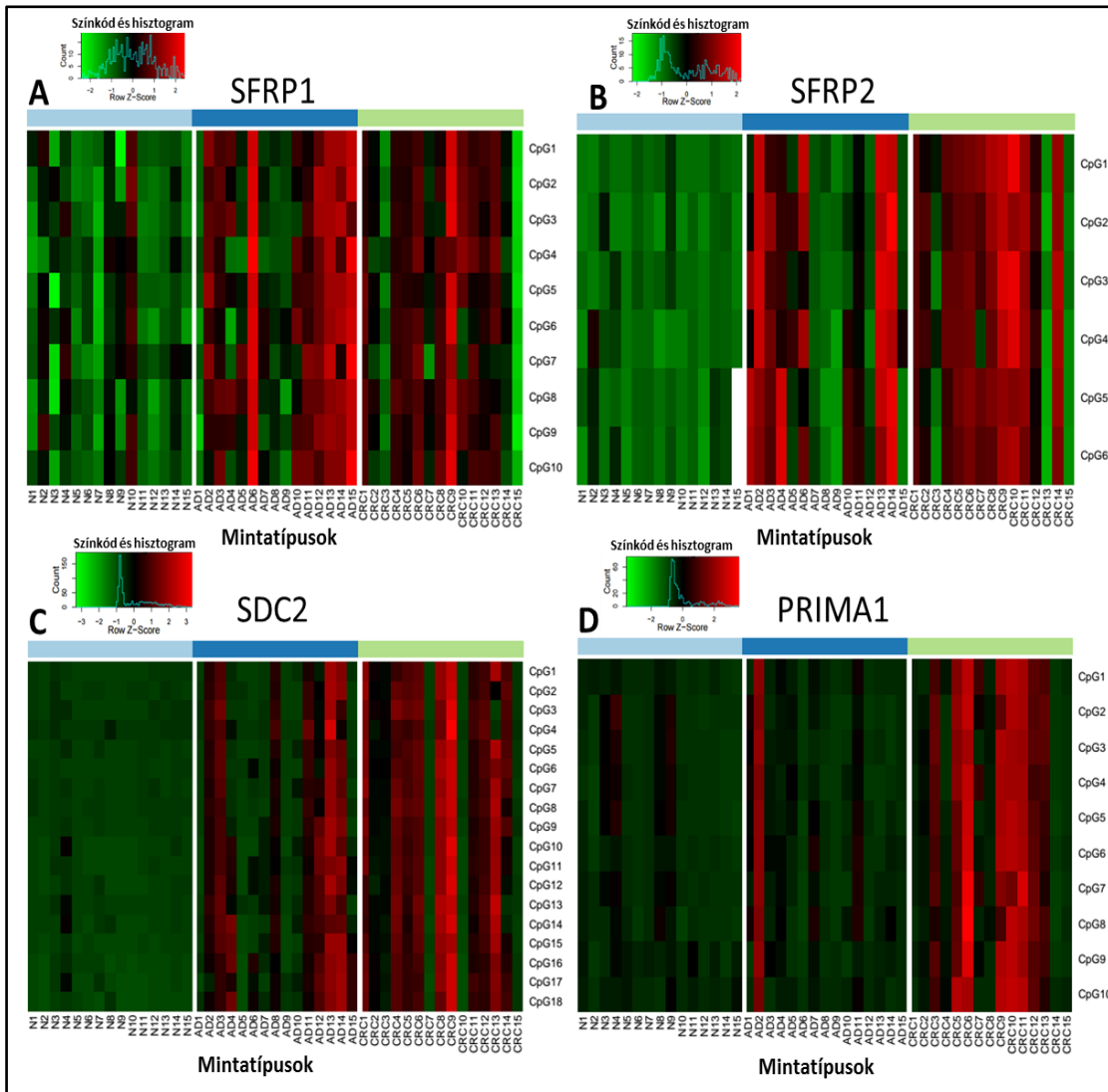
17. ábra. C38 tumorsejttel oltott állatokba injektált humán nem-metilált (A) és metilált (B) ampliconok bomlásának üteme. A humán metilált DNS fragmentumok 24 óra elteltével is nagy mennyiségben kimutathatók voltak az egerek plazmamintáiban.

Összehasonlítva a tumoros és egészséges egerekből származó mintákat, megfigyelhető, hogy a daganatos mintákból származó humán nem-metilált DNS jelen van a kezelés után 6 órával, a metilált fragmentum pedig 24 óra elteltével is nagyobb mennyiségben kimutatható, mint az egészséges, humán metilált DNS-sel kezelt állatok mintáiban.

5.2. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének DNS metilációjának vizsgálata humán mintákban

5.2.1. Piroszekvenálási adatok kiértékelése

A négy elemzett gén (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1*) promóter régiójában 44 CpG helyet választottunk ki, amelyeknek a DNS metilációs szintjét a piroszekvenálást követően állapítottuk meg. A későbbiekben ugyanezeket a régiókat MethyLight PCR segítségével is megvizsgáltuk. Minden CpG hely metilációjának mértékét külön-külön határoztuk meg, majd összevetettük a különböző mintacsoportok között. A 15 egészséges, 15 adenómás és 15 CRC-s beteg szöveti mintáihoz tartozó metiláció százalékos értékeit hőtérképen ábrázoltuk (18. ábra). Az *SFRP1* gén esetében 10 CpG pozíció esett a vizsgált régióba, és 9 mutatott szignifikáns különbséget adenóma és CRC mintákban az egészségesekhez képest ($p < 0,05$) (18. ábra/A). Az *SFRP2* markerhez tartozó összes (6 db) CpG hely metilációja szignifikánsan magasabb volt az elváltozásokban, mint az ép mintákban ($p < 0,05$) (18. ábra/B). Az *SDC2* promóterében 11 CpG pozícióban találtunk magasabb metilációs arányt az AD és CRC mintákban, mint az egészségesekben, és további 6 pozíció mutatott emelkedett metilációt a daganatos mintákban az adenómákhoz viszonyítva ($p < 0,05$). A CpG4 jelölésű metilációs hely esetében csak a CRC vs. egészséges összehasonlításban tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$), az adenóma vs. ép összevetésben viszont nem volt szignifikáns az eltérés (18. ábra/C). A *PRIMA1* promóter régiójában 10 CpG hely esett az általunk vizsgált szakaszra, és az összes nagymértékben metilált volt a rákos mintákban ($p < 0,05$), és mérsékelt metilációs szint emelkedést tapasztaltunk az adenóma mintákban is az egészségesekhez képest (18. ábra/D).



18. ábra. A 4 vizsgált génhez tartozó, kiválasztott CpG helyek metilációs státusza piroszekvenálással elemezve. A hőterképen látható az *SFRP1* (A), az *SFRP2* (B), az *SDC2* (C) és a *PRIMA1* (D) gének promóter régiójában elhelyezkedő elemzett CpG pozíciók metilációs szintje vastagbél szöveti mintákban. Színskála: zöld – alacsony metiláció; fekete – közepes szintű metiláció; piros – magas metiláció. A minták az oszlopokban találhatóak: világoskék jelölés – egészségesek; sötétkék – adenómák; világoszöld – vastagbélrákosak. Rövidítések: N – normális; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák; CpG – citozin-foszfát-guanin dinukleotid.

5.2.2. A DNS metilációs mintázat *in silico* vizsgálata Methyl capture szekvenálási adatok alapján

A piroszekvenálási módszerrel analizált DNS régiók metilációs állapotát *in silico* elemeztük 6 NAT, 15 AD és 9 CRC biopsziás szövetminta adatait tartalmazó független mintahalmazon. Kutatócsoportunk MetCap szekvenálási adataiból meghatároztuk a

MethyLight PCR-rel vizsgált szakaszokkal átfedő DMR-ek metilációs státuszának mértékét (β -érték), majd kiszámoltuk a diagnosztikai csoportok közötti $\Delta\beta$ -értékeket (13. táblázat). Az *SFRP1* és az *SDC2* promóterekben vizsgált DMR-ek szignifikánsan magas hipermetilációt mutattak mind az adenóma (*SFRP1* $\Delta\beta=0,60$; *SDC2* $\Delta\beta=0,65$ és $0,50$), mind a vastagbélrákos (*SFRP1* $\Delta\beta=0,49$; *SDC2* $\Delta\beta=0,59$ és $0,37$) biopsziákban. Fokozott metilációt találtunk a *PRIMA1* promóterében is adenómákban a NAT mintákhoz képest ($\Delta\beta=0,29$ és $0,43$) ($p<0,01$). A vastagbélrákos betegektől származó biopsziákban is emelkedett metilációt tapasztaltunk a kontrollokhoz képest, bár a változás mértéke nem érte el a szignifikancia szintet ($\Delta\beta=0,07$ és $0,18$). Mérsékelten magas metilációt találtunk az *SFRP2* gén esetében AD és CRC mintákban egyaránt, és adenómákban szignifikáns is volt az eltérés a NAT mintákhoz képest ($\Delta\beta=0,29$ és $0,07$) ($p<0,05$).

13. táblázat. A mintacsoportok közötti metilációs eltérések ($\Delta\beta$) a 4 gén adott szakaszain MetCap szekvenálással vizsgálva. A szignifikáns eltéréseket csillaggal (*) jelöltük. Rövidítések: NAT – normal adjacent tissue (tumor melletti ép szövet); CRC – vastagbélrák.

Gén szimbólum	Methyl capture szekvenálási pozíció	ADENÓMA vs. NAT		CRC vs. NAT		CRC vs. ADENÓMA	
		$\Delta\beta$	p-érték	$\Delta\beta$	p-érték	$\Delta\beta$	p-érték
SFRP1	chr8:41,166,201-41,166,300	0,60 *	1,49E-04	0,49 *	3,39E-03	-0,11	3,76E-01
SFRP2	chr4:154,710,401-154,710,500	0,29 *	5,38E-02	0,12	3,86E-01	-0,16	2,34E-01
	chr4:154,710,501-154,710,600	0,07 *	4,26E-02	0,03	3,41E-01	-0,04	3,81E-01
SDC2	chr8:97,506,201-97,506,300	0,65 *	6,63E-04	0,59 *	4,84E-03	-0,05	7,40E-01
	chr8:97,506,301-97,506,400	0,50 *	4,31E-04	0,37 *	2,99E-02	-0,12	4,92E-01
PRIMA1	chr14:94,255,201-94,255,300	0,29 *	9,28E-03	0,07	3,04E-01	-0,22	1,18E-01
	chr14:94,255,301-94,255,400	0,43 *	1,33E-03	0,18	1,43E-01	-0,26	1,27E-01

5.2.3. Illumina Infinium metilációs adatok *in silico* elemzése a vizsgált 4 marker teljes promóter szakaszain

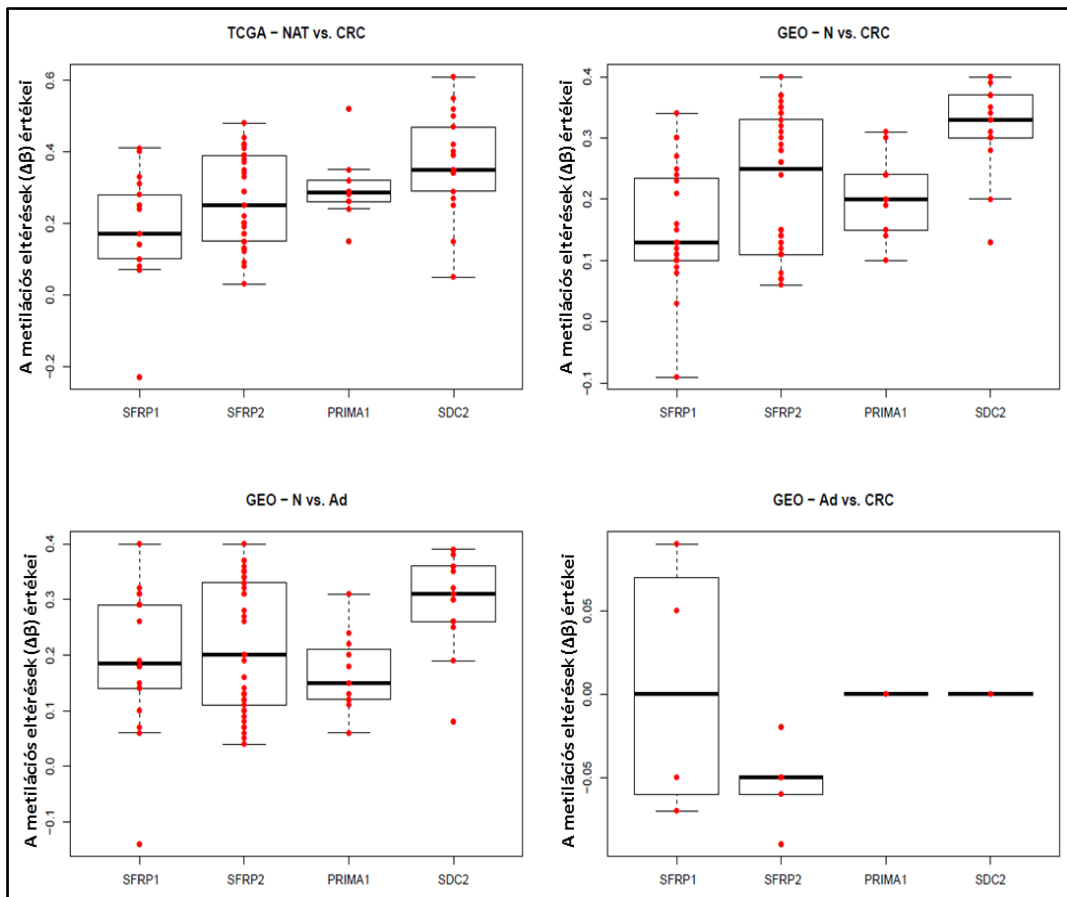
Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének teljes promóter régiójának DNS metilációját is megvizsgáltuk a TCGA, illetve GEO adatbázisban található Illumina HumanMethylation450K DNA metilációs array adatokat felhasználva (19. ábra). A 4 marker promóterében elhelyezkedő 99 CpG hely β -értékét határoztuk meg. A TCGA adatbázisból NAT (n=39) és CRC (n=39) biopsziák szekvenálási adatait elemeztük (14. táblázat). Az *SFRP1* promóterében 24 CpG pozíciót találtunk, amelyből 16 szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutatott CRC mintákban, mint a párosított NAT-okban (átlag $\Delta\beta=0,21$; $p<0,05$). Az *SFRP2* promóter régiójában fokozott metilációt találtunk a vizsgált 47-ből 42 CpG pozícióban a rákos biopsziákban, amelyek közül 7 CpG hely a MethyLight próbákkal is vizsgált területen belül helyezkedett el. Az *SDC2* marker promóterében 17 CpG pozíció helyezkedett el, és az összes szignifikánsan magasabb metilációs arányt mutatott a daganatos mintákban a kontrollokhöz képest ($p<0,05$). A *PRIMA1*-hez tartozó CpG helyek 91%-a (10/11) mutatott hipermetilációt a CRC biopsziákban ($p<0,05$).

A TCGA adatbázisból letöltött adatok mellett Luo és mtsai. [186] által publikált metilációs array adatokat (GSE48684) is újraelemeztük, és meghatároztuk a metilációs különbségeket ($\Delta\beta$) adenóma vs. egészséges, CRC vs. egészséges és CRC vs. adenóma összehasonlításokban (14. táblázat). A vastagbélrákos biopsziákban 22, az *SFRP1* gén promóteréhez tartozó CpG pozíció mutatott szignifikánsan magasabb metilációs szintet a kontrollokhöz képest ($p<0,05$). A CRC vs. adenóma mintacsoportok összevetésekor két pozíció esetében (cg07935886, cg23359714) találtunk fokozott metilációt a CRC mintákban, és 2 CpG hely (cg02388150, cg24319902) alacsonyabb szintű metilációt jelzett a rákos biopsziákban ($p<0,05$). Az *SFRP2* promóterében 45 CpG intenzíven metilálódott az adenómákban az egészségesekhez képest (átlag $\Delta\beta=0,23$; $p<0,05$), és 42 pozíció pedig a CRC biopsziákban is hipermetiláltnak mutatkozott. Az *SDC2* génhez tartozó összes CpG hely fokozottan metilált volt adenóma és CRC mintákban is a kontrollokhöz képest ($p<0,05$), és a cg16935295 azonosítójú CpG hely - amelyet MethyLight PCR-rel is elemeztünk - intenzív hipermetilációt mutatott az adenóma ($\Delta\beta=0,41$; $p<0,05$) és a CRC ($\Delta\beta=0,39$; $p<0,05$) mintákban egyaránt az egészségesekhez viszonyítva. A *PRIMA1* promóterében elhelyezkedő CpG-k közül szintén az összes hipermetiláltnak mutatkozott az adenómás betegekből származó

biopsziákban (átlag $\Delta\beta=0,17$; $p<0,05$), és 10 CpG hely a daganatos mintákban is fokozott metilációt mutatott (átlag $\Delta\beta=0,21$; $p<0,05$).

14. táblázat. A mintacsoportok közötti metilációs eltérések ($\Delta\beta$) átlaga a 4 vizsgált gén promóter régiójában a TCGA és GEO adatbázis alapján. Rövidítések: TCGA – The Cancer Genome Atlas; GEO – Gene Expression Omnibus; N – normális; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

Gén szim-bólum	Vizsgált CpG helyek száma (db)	TCGA		GEO (GSE48684)					
		NAT vs. CRC	átlag $\Delta\beta$ ($p<0,05$)	N vs. CRC	átlag $\Delta\beta$ ($p<0,05$)	N vs. AD	átlag $\Delta\beta$ ($p<0,05$)	AD vs. CRC	átlag $\Delta\beta$ ($p<0,05$)
SFRP1	24	66% (16/24)	0,21	92% (22/24)	0,17	75% (18/24)	0,22	8% (2/24)	0,07
SFRP2	47	89% (42/47)	0,28	89% (42/47)	0,24	96% (45/47)	0,23	0	0
SDC2	17	100% (17/17)	0,37	94% (16/17)	0,32	94% (16/17)	0,31	0	0
PRIMA1	11	91% (10/11)	0,30	91% (10/11)	0,21	100% (11/11)	0,17	0	0

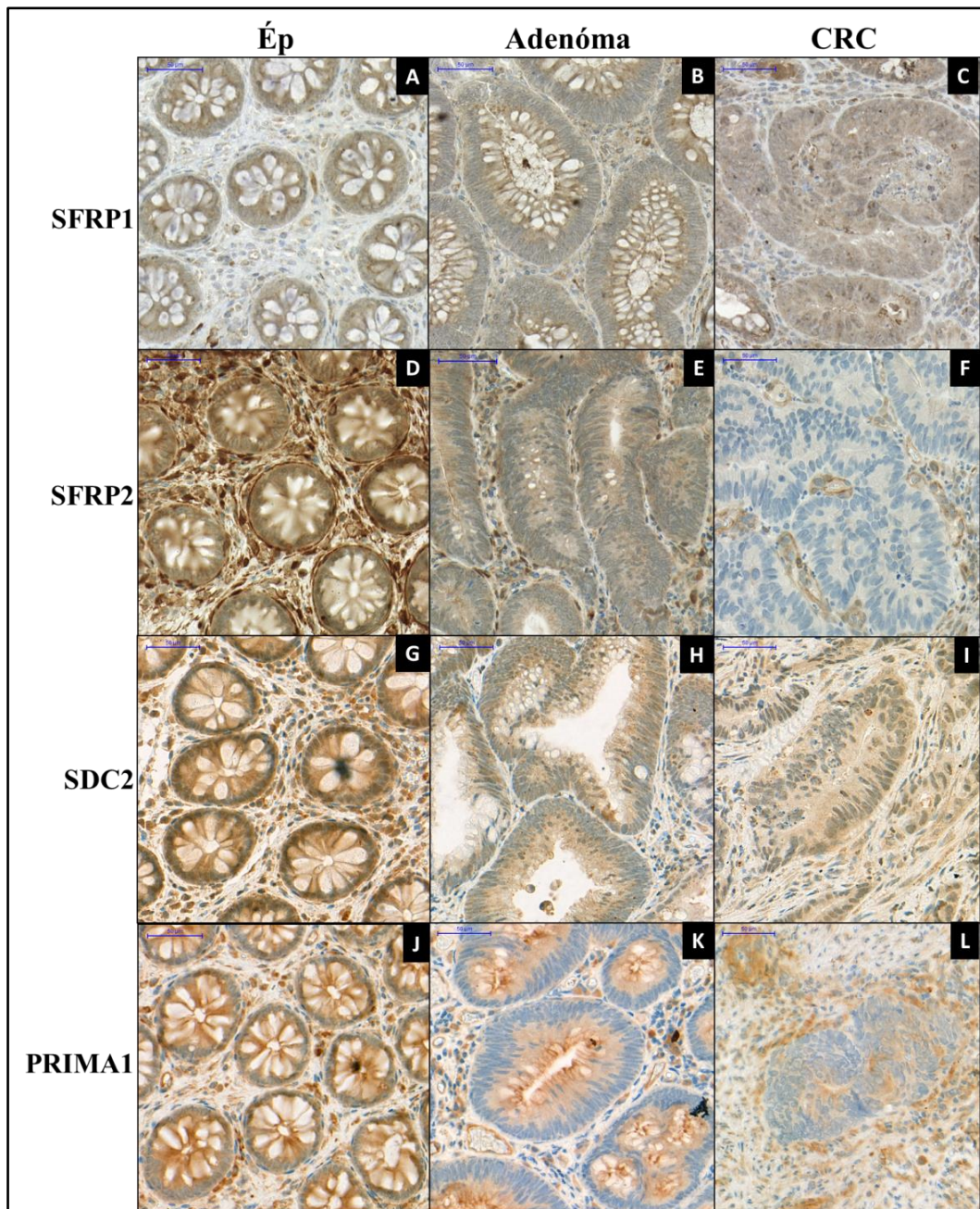


19. ábra. A mintacsoportok közötti metilációs eltérések ($\Delta\beta$) box-plot ábrázolása a TCGA és GEO adatbázisból letöltött adatok alapján. Az y-tengelyen a metilációs eltérések mértéke ($\Delta\beta$) látható, az x-tengelyen a vizsgált markerek találhatóak. A piros pontok jelölik a mintákhoz tartozó $\Delta\beta$ -értékeket. A téglalapokban lévő vonal a mediánt, a téglalap magassága a szórást mutatja. Látható, hogy mind a négy marker esetében az adenóma és CRC mintákban is viszonylag magas metilációs értékeket tapasztaltunk az egészségesekhez képest. Rövidítések: N – normális; Ad – adenóma; CRC – vastagbélrák; TCGA – The Cancer Genome Atlas; GEO – Gene Expression Omnibus.

5.2.4. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének promóter metilációjának hatása a fehérje expresszióra

A promóter hipermetiláció fehérje expresszióra gyakorolt hatásának bizonyítására immunhisztokémiai elemzéseket végeztünk (20. ábra). Az *SFRP1* mérsékelt (intenzitás +2) citoplazmatikus kifejeződést mutatott az egészséges hámban. A strómális sejtek nagy része gyenge fehérje expressziót jelzett (+1), de néhány sejtben erős (+3) *SFRP1* kifejeződést figyeltünk meg (ΣQ -score: $281,50 \pm 45,03$; 20. ábra/A). Csökkent (+2 és

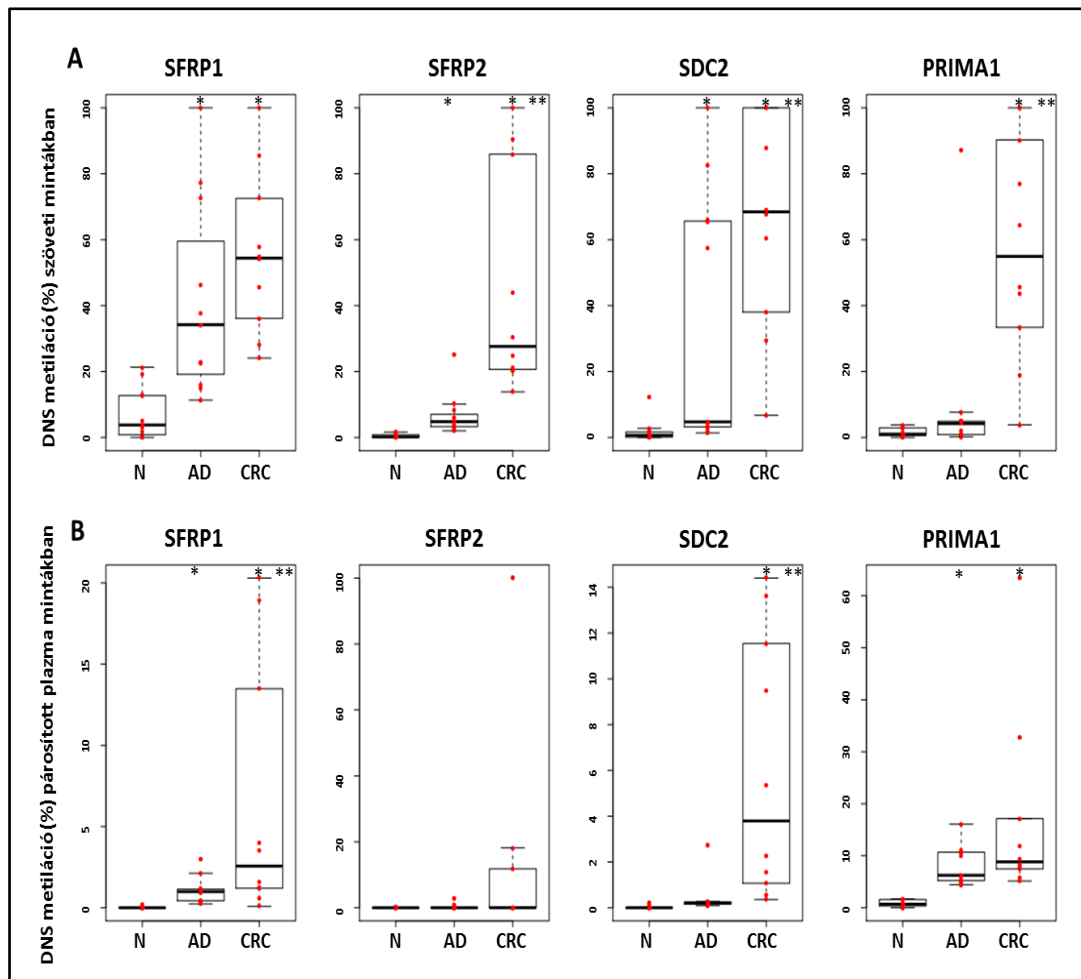
+1) SFRP1 expressziót tapasztaltunk mind a hám, mind a strómális sejtekben adenóma (ΣQ -score: $237,22 \pm 51,96$; 20. ábra/B) és CRC (ΣQ -score: $199,16 \pm 54,71$; 20. ábra/C) mintákban egyaránt. Szignifikáns eltérést azonban csak az egészséges és CRC minták között találtunk ($p < 0,001$). Erős (+3) citoplazmatikus SFRP2 kifejeződést figyeltünk meg az egészséges felszíni hámiban, valamint közepes erősségű festődést (+2) a mirigyhámiban. A strómális sejtek erős (+3) SFRP2 expressziót mutattak (ΣQ -score: $433,33 \pm 39,15$; 20. ábra/D). Ezekkel ellentétben, az adenómákban és a rákos mintákban alacsonyabb (+1 és 0) SFRP2 fehérje szintet detektáltunk, amely elsődlegesen a hámrétegre korlátozódott (ΣQ -scores: AD: $253,34 \pm 43,01$; CRC: $228,75 \pm 40,86$; 20. ábra/E és F). Az egészséges hám és stróma rétegben az SDC2 fehérje mérsékelt (+2) citoplazmatikus és magfestődést mutatott (ΣQ -score: $281,42 \pm 44,13$; 20. ábra/G). Szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb (+2 and +1) fehérje kifejeződést figyeltünk meg az adenóma (ΣQ -score: $202,00 \pm 30,84$; 20. ábra/H) és rákos (ΣQ -score: $198,34 \pm 53,14$; 20. ábra/I) mintacsoportokban egyaránt. Erős (+3) citoplazmatikus PRIMA1 expressziót detektáltunk a normális vastagbél mintákban (ΣQ -score: $416 \pm 32,86$; 20. ábra/J), ellenben szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,05$) kifejeződést láttunk az adenóma (ΣQ -score: $305 \pm 33,91$; 20. ábra/K) és a tumoros (ΣQ -score: $281,66 \pm 64,93$; 20. ábra/L) szövetekben is.



20. ábra. Az SFRP1, az SFRP2, az SDC2 és a PRIMA1 fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei vastagbél biopszia mintákban. Az immunhisztokémiai elemzés segítségével vizsgáltuk az SFRP1 (A, B, C), az SFRP2 (D, E, F), az SDC2 (G, H, I) és a PRIMA1 (J, K, L) fehérjék expressziójának változását egészséges, adenóma és CRC mintákban. Csökkenő fehérje kifejeződést figyeltünk meg az adenóma – karcinóma szekvencia során. Digitális mikroszkópos felvétel, 30x nagyítás, méretegység: 50 µm. Rövidítések: CRC – vastagbélrák.

5.2.5. A 4 marker DNS metilációs mintázata párosított szövet- és plazmamintákban

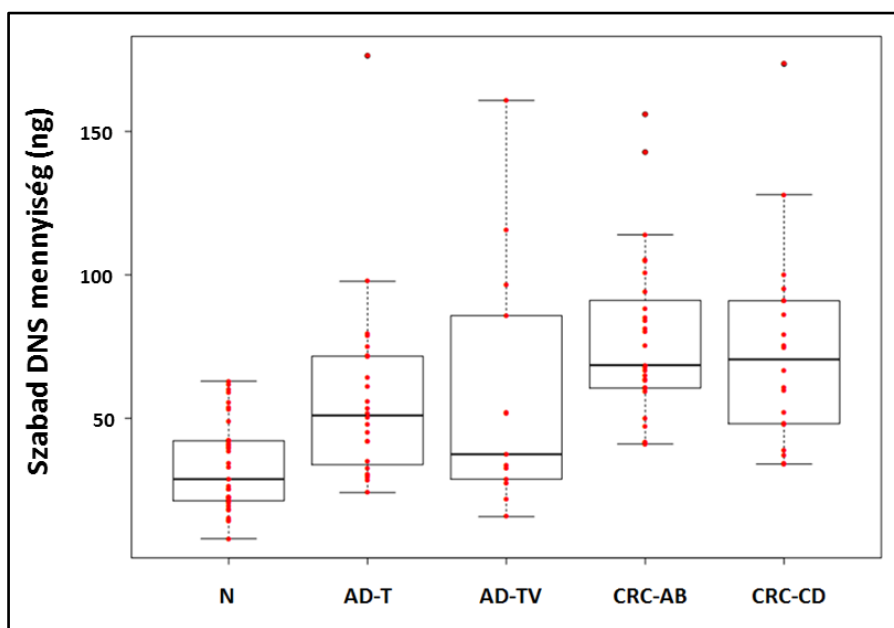
Az általunk vizsgált 4 gén promóterének kiválasztott szakaszait MethyLight PCR technikával tanulmányoztuk az immunhisztokémiai vizsgálatba is bevont 32 beteg vastagbél biopszia és plazmamintáin (21. ábra). Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének promótereinek átlag metilációja adenóma szöveti mintákban $41,39 \pm 29,58\%$ -os, $6,7 \pm 6,61\%$ -os; $35,48 \pm 38,69\%$ -os, illetve $10,76 \pm 25,46\%$ -os volt. A fenti arányok CRC biopsziákban tovább emelkedtek, az egészséges mintákban azonban szignifikánsan alacsonyabb metilációs értékeket találtunk ($p < 0,05$) (21. ábra/A). A párosított plazmamintákban a szöveti mintákban mérthez hasonló tendenciát figyeltünk meg. Az egészséges kontrollokban a metiláció mértéke a *PRIMA1* ($0,83 \pm 0,68\%$) kivételével 1% alattinak mutatkozott, majd adenómában és CRC-ben fokozott emelkedést tapasztaltunk (21. ábra/B). Adenómás betegek plazmáiban az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* promóter metilációja $1,16 \pm 0,82\%$ -os; $0,36 \pm 0,87\%$ -os; $0,44 \pm 0,8\%$ -os és $8,03 \pm 3,87\%$ -os, míg a daganatos betegek plazmamintáiban $6,5 \pm 7,92\%$ -os; $13,01 \pm 31,23\%$ -os; $6,01 \pm 5,69\%$ -os és $16,89 \pm 18,27\%$ -os volt.



21. ábra. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének promótereinek DNS metilációs szintjei box-plot ábrázolással párosított vastagbél biopszia (A) és plazmamintákban (B) a MethyLight PCR eredmények alapján. Az y-tengelyen láthatóak a metiláció százalékos értékei, a piros pontok az adott mintához tartozó metilációs százalékos értékeket jelzik. A téglalapokban lévő vonal a mediánt, a téglalap magassága a szórást jelöli. Az adenóma vs. egészséges, és CRC vs. egészséges mintacsoportok összehasonlítása esetén a szignifikáns eltéréseket ($p < 0,05$) csillaggal (*), az adenóma vs. CRC csoportok összevetése esetén kettős csillaggal (**) jelöltük. Mind a négy gén esetén folyamatos metilációs szint emelkedést tapasztaltunk az egészséges – adenóma – CRC szekvencia során szöveti mintákban, és hasonló tendenciát figyeltünk meg plazmaminták esetén is. Rövidítések: N – normális; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

5.2.6. A sejten kívüli szabad DNS (skDNS) mennyisége

Kísérletünk során összesen 121 plazmamintában határoztuk meg a szabad DNS mennyiségét. Az skDNS koncentráció minden mintacsoportban nagymértékű variabilitást mutatott (22. ábra). Összmenyiségének átlaga egészséges egyéneknél $33,41 \pm 15,49$ ng; adenómás betegekben $58,03 \pm 36,49$ ng; és vastagbélrákban szenvedőkben pedig $75,98 \pm 30,74$ ng volt 3,5 ml plazmából izolálva. Az adenóma szövettani altípusainak elemzése során megállapítottuk, hogy a tubuláris (T) adenóma minták szabad DNS mennyisége $56,01 \pm 36,9$ ng, míg a tubulovillózus (TV) adenómák $60,68 \pm 36,98$ ng volt. A korai CRC stádiumban (Dukes A, B) lévő daganatos betegek esetén az skDNS összmenyisége $75,99 \pm 28,5$ ng-nak, míg az előrehaladott CRC stádiumban (Dukes C, D) lévőké pedig $75,97 \pm 34,7$ ng-nak mutatkozott. Szignifikáns eltérést találtunk az elváltozások vs. egészséges, a korai CRC vs. tubulovillózus adenóma és a CRC vs. tubuláris adenóma összehasonlítások során is (Mann-Whitney *U* teszt, $p < 0,01$). Továbbá mérsékelt skDNS mennyiség emelkedést tapasztaltunk azokban a betegekben, akiknek 1-nél több adenómájuk volt azokkal szemben, akiknél csupán egy adenómát találtak ($p = 0,05$) (15. táblázat).

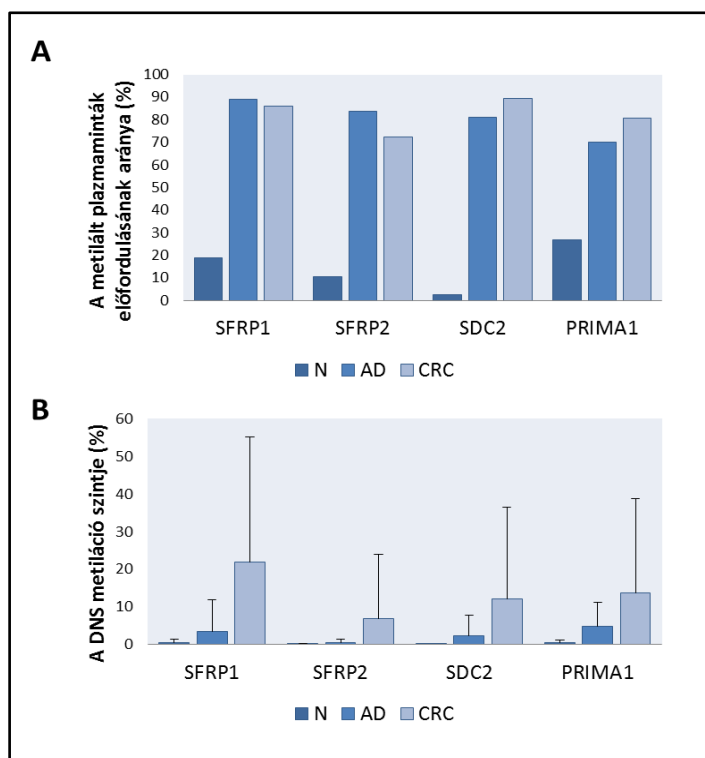


22. ábra. A 121 plazmamintában található szabad DNS mennyisége mintacsoportonként. A piros pontok a mintánkénti skDNS mennyiséget mutatják (3,5 ml plazmából izolálva), a téglalapban található vonal a mediánt, a téglalap mérete a szórást jelöli. A legalacsonyabb skDNS mennyiséget az egészséges mintákban mértünk, legmagasabbat pedig az előrehaladott vastagbélrákban szenvedő betegek

plazmamintáiban tapasztaltuk. Rövidítések: N – normális; AD-T – tubuláris adenóma; AD-TV – tubulovillózus adenóma; CRC-AB – korai stádiumú vastagbélrák (Dukes A és B); CRC-CD – késői stádiumú vastagbélrák (Dukes C és D).

5.2.7. Az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének promóter metilációjának gyakorisága és mértéke plazmamintákban

A négy vizsgált gén promóterében elhelyezkedő, előzetes kísérleteink alapján kiválasztott DNS szakaszok metilációs státuszát MethyLight PCR módszerrel vizsgáltuk 121 plazmamintában (23. ábra). Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* promóterek metilációját a CRC minták 85,1%-ában (40/47), 72,3%-ában (34/47), 89,4%-ában (42/47), illetve 80,9%-ában (38/47), valamint az adenómák 89,2%-ában (33/37), 83,8%-ában (31/37), 81,1%-ában (30/37), és 70,3%-ában (26/37) figyeltük meg. Az egészséges kontroll mintákban azonban sokkal alacsonyabb arányban tapasztalunk metilációt (18,9% (7/37), 10,8% (4/37), 2,7% (1/37) és 27% (10/37)) (23. ábra/A). A metiláció előfordulásának gyakorisága mind a négy marker esetében szignifikánsan magasabb volt az elváltozásokban az egészséges mintákban tapasztaltakhoz viszonyítva ($p < 0,0002$; minden esetben). Az *SFRP1* és a *PRIMA1* gének esetében nagyobb metilációs előfordulást láttunk az előrehaladott CRC stádiumok esetén (Dukes C, D), mint a rák korai szakaszában (Dukes A, B) ($p < 0,05$). A fenti különbséget az *SFRP2* ($p = 0,35$) és az *SDC2* ($p = 0,28$) gének esetén nem tapasztaltuk. Kombinált elemzés alkalmazásával a 4 markerből legalább három fokozott metilációt mutatott a CRC-s minták 89%-ában (42/47) és az adenómák 81%-ában (30/37). Négy kontroll (11%) páciens mintáiban figyeltünk meg emelkedett metilációs szintet, akiről az utánkövetés során kiderült, hogy gyulladáisos betegségekben szenvednek.



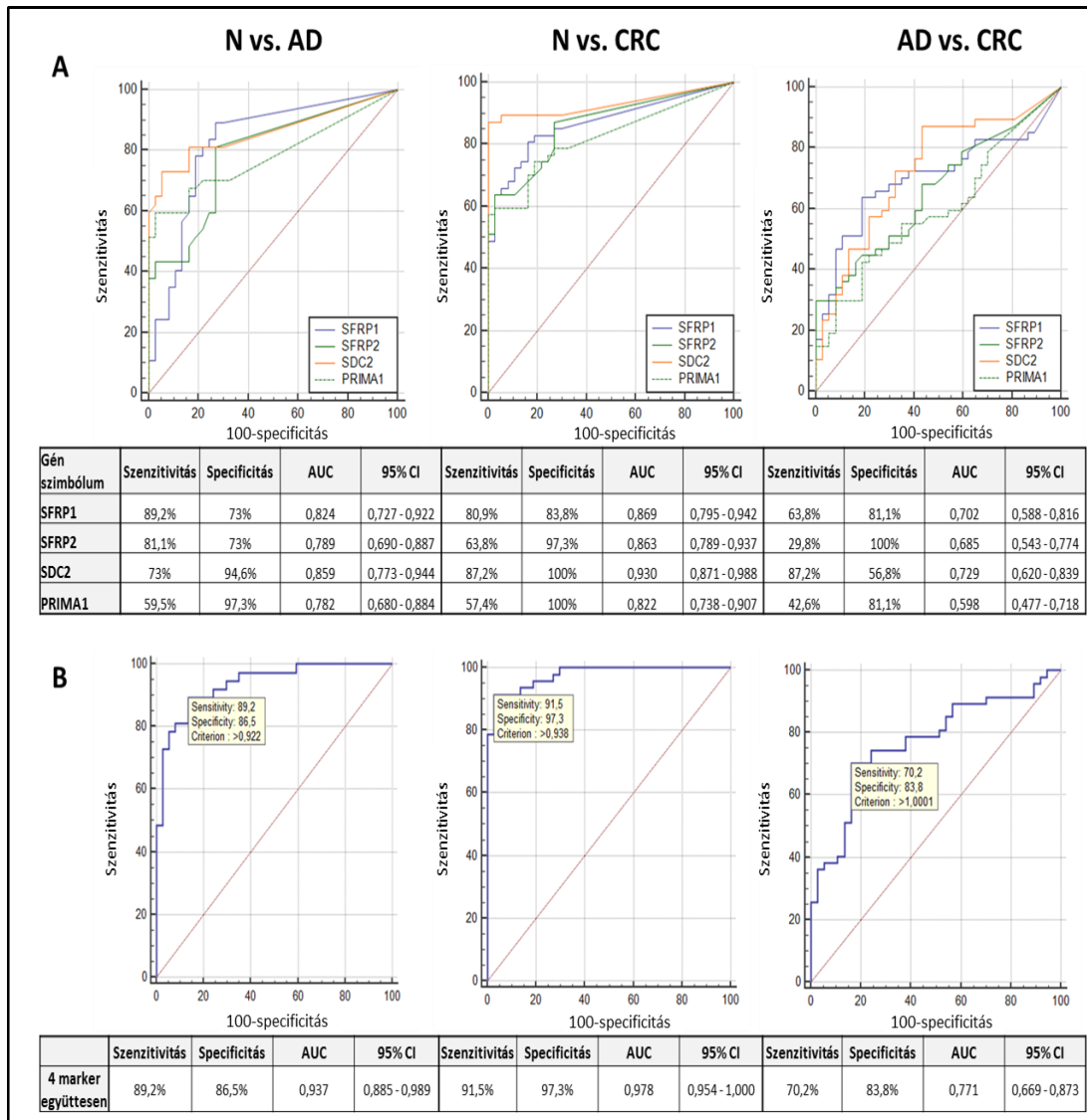
23. ábra. DNS metiláció gyakorisága (A) és szintje (B) a 4 vizsgált gén promóterében plazmaminták esetén. A metiláció előfordulása mind a 4 gén esetén magasabb volt az adenóma és CRC mintákban, mint az egészségesekben ($p < 0,05$) a MethyLight PCR eredmények alapján. A metiláció szintje normális mintákban nagyon alacsony volt, azonban AD és CRC minták esetén folyamatos emelkedést tapasztaltunk. Rövidítések: N – egészséges; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

A kiválasztott gének DNS metilációs szintjének elemzésekor folyamatos emelkedést figyeltünk meg az egészséges – vastagbél adenóma – karcinóma szekvencia során. A kontroll mintákban az átlag metiláció aránya 1% alatti volt mind a négy marker esetében (23. ábra/B). Adenómákban a legmagasabb metilációs szintet a *PRIMA1* gén promóterében találtunk ($4,73 \pm 6,41\%$), a rákos mintákban pedig az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációja $21,77 \pm 33,32\%$ -osnak; $6,82 \pm 17,1\%$ -osnak; $12,06 \pm 24,37\%$ -osnak és $13,66 \pm 25,14\%$ -osnak adódott. Az adenómás és CRC-s betegektől származó plazmamintákban mért négy marker metilációs szintjének részletes értékei és azok klinikopatológiai jellemzőkkel való összevetése a 15. táblázatban található. Nem találtunk szignifikáns eltérést a DNS metiláció mértéke és az elemzett klinikopatológiai paraméterek között, habár az átlag metiláció aránya mind a négy marker esetén magasabb volt a késői stádiumú rákos (Dukes C, D) betegeknél, a koraihoz (Dukes A, B) képest.

15. táblázat. Az skDNS mennyiségének, valamint az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének metilációs státuszának összefüggései a klinikopatológiai jellemzőkkel.

Változók	N (%)	Szabad DNS össz-mennyiség (ng)		Metiláció aránya (átlag ± szórás)							
		skDNS (ng)	p-érték	SFRP1		SFRP2		SDC2		PRIMA1	
				(%)	p-érték	(%)	p-érték	(%)	p-érték	(%)	p-érték
VASTAGBÉL ADENÓMA											
Méret		0,18		0,35		0,38		0,77		0,99	
≤ 1 cm	18 (48,6)	66,43 ± 46,92		4,36 ± 10,66		0,32 ± 0,54		3,05 ± 7,31		4,88 ± 6,38	
> 1cm	19 (51,4)	50,07 ± 21,14		2,68 ± 5,30		0,70 ± 1,10		1,43 ± 0,54		4,58 ± 6,60	
Szám		0,05		0,84		0,88		0,91		0,37	
1	15 (40,5)	44,14 ± 19,51		2,19 ± 3,66		0,65 ± 1,12		2,66 ± 7,67		4,13 ± 7,19	
≥2	22 (59,5)	67,5 ± 42,39		4,39 ± 10,31		0,42 ± 0,68		1,92 ± 3,31		5,13 ± 5,95	
Szövet-tani jellemzők		0,57		0,49		0,79		0,42		0,39	
Tubuláris	20 (54,1)	56,01 ± 36,9		5,16 ± 11,00		0,43 ± 0,73		2,74 ± 6,97		6,06 ± 7,97	
Tubulo-villózus	14 (37,8)	60,68 ± 36,98		1,34 ± 1,62		0,54 ± 0,96		1,91 ± 3,00		2,87 ± 3,76	
Hiper-plasztikus	3 (8,1)	58,71 ± 28,59		2,48 ± 1,70		0,93 ± 1,58		0,12 ± 0,11		4,5 ± 0,70	
VASTAGBÉLRÁK											
DUKES-stádium		0,77		0,14		0,96		0,85		0,13	
A-B	27 (57,4)	75,99 ± 28,5		20,48 ± 33,11		4,79 ± 10,73		9,5 ± 18,16		11,96 ± 25,49	
C-D	20 (42,6)	75,97 ± 34,7		23,51 ± 34,39		9,56 ± 23,18		15,52 ± 31,05		15,94 ± 25,12	
Elhelyezkedés		0,75		0,17		0,18		0,98		0,1	
Colon	22 (46,8)	74,41 ± 26,11		17,76 ± 30,69		7,27 ± 21,22		6,81 ± 11,03		6,81 ± 9,47	
Rectum	25 (53,2)	77,36 ± 34,79		25,30 ± 35,72		6,42 ± 12,90		16,69 ± 31,37		19,68 ± 32,43	
Nyirok-csomó áttét		0,57		0,1		0,1		0,93		0,65	
N0	23 (48,9)	78,63 ± 30,85		15,66 ± 25,54		7,77 ± 21,27		10,72 ± 19,49		13,89 ± 27,22	
N1-3	24 (51,1)	73,44 ± 31,07		27,63 ± 39,03		5,91 ± 12,27		13,35 ± 28,65		13,43 ± 23,55	

A 4 marker szenzitivitás és specificitás értékeinek megállapítása Receiver Operating Characteristic (ROC) elemzéssel történt (24. ábra/A). Az AD vs. N összehasonlításban az *SFRP1* mutatta a legmagasabb érzékenységet (89,2%) 73%-os specificitás mellett (AUC=0,824; 95% CI 0,727 - 0,922), valamint a *PRIMA1* esetében kaptuk a legalacsonyabb szenzitivitást (59,5%) 97,3%-os specificitás értékkel (AUC=0,782; 95% CI 0,680 - 0,884). A tumoros és egészséges minták összevetésekor az *SDC2* tűnt a legmegbízhatóbb markernek (87,2%-os szenzitivitás és 100%-os specificitás; AUC=0,930; 95% CI 0,871 - 0,988). A CRC vs. adenóma összehasonlításban 29,8%-87,2% közötti szenzitivitás és 56,8%-100% közötti specificitás értékeket kaptunk. A négy marker elkülönítési hatékonyságát együttesen is elemeztük (24. ábra/B) logisztikus regresszió analízissel. Megállapítottuk, hogy a markerek igen magas érzékenységgel és specifikusan képesek elkülöníteni a rákos mintákat az egészségesektől (91,5%-os szenzitivitás, 97,3%-os specificitás; AUC=0,978; 95% CI 0,954 - 1,000) és az adenómáktól is (70,2%-os szenzitivitás, 83,8%-os specificitás; AUC=0,771; 95% CI 0,669 - 0,873). Az adenóma minták szintén nagy hatásfokkal megkülönböztethetők a kontrolltól a 4 tanulmányozott marker segítségével (89,2%-os szenzitivitás, 86,5%-os specificitás; AUC=0,937; 95% CI 0,885 - 0,989).



24. ábra. A négy elemzett gén szenzitivitás és specifitás értékei markerenként (A) és együttesen (B) adenóma vs. egészséges, CRC vs. egészséges, és CRC vs. adenóma összehasonlításokban. Az ábrán a szenzitivitás és specifitás értékek mellett a 95%-os konfidencia intervallumot (95% CI) és az Area Under the Curve (AUC) értékeket tüntettük fel. Az AUC a ROC-görbe által elhatárolt terület nagyságát jellemzi. Rövidítések: N – normális; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

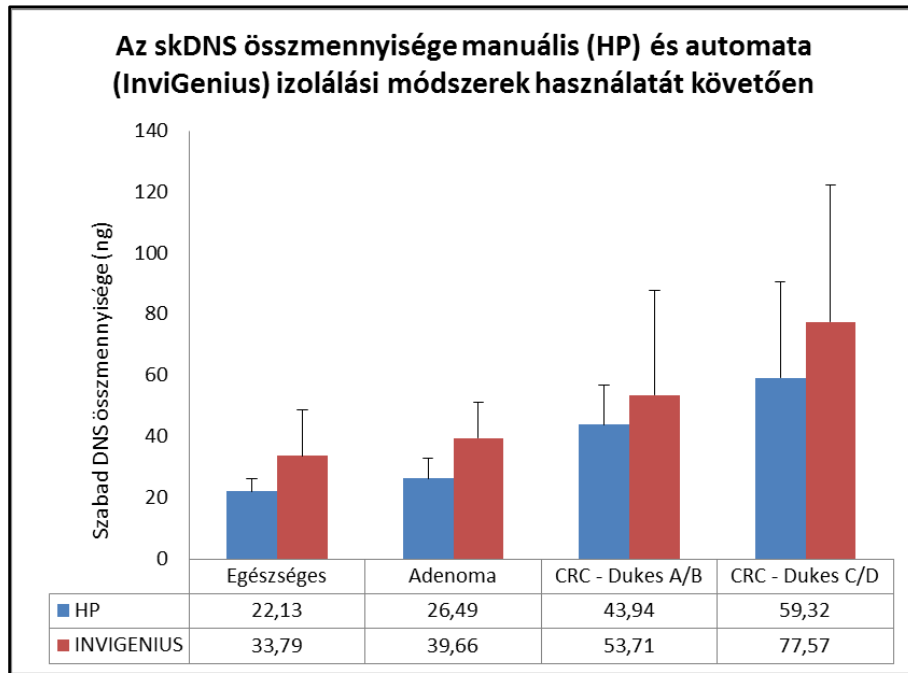
5.3. Különböző skDNS izolálási módszerek hatásának elemzése a metilációs mintázatra

5.3.1. A High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (HP) és az Epi proColon 2.0 (EpC) kézi izoláló kitek összevetése

A szabad DNS mennyiségét és az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációjának szintjét 10 egészséges, 10 AD és 10 CRC plazmamintában vizsgáltuk kétféle DNS izolálási és biszulfid konverziós kit alkalmazásával. Az Epi proColon 2.0 kit nem tartalmaz koncentráció mérési lépést, mivel a DNS izolálása és biszulfid konverziója szorosan kapcsolt, ezért az skDNS mennyiségét a HP kit alkalmazása után tudtuk csak meghatározni. Az skDNS össz mennyiség átlaga egészséges mintákban $16,7 \pm 4,76$ ng, adenómák esetén $49,23 \pm 13,03$ ng, míg CRC-s plazmákban $69,64 \pm 74,47$ ng volt. A normális minták közül 3-3 mutatott metilációt mindkét kit használata után, adenómák közül a HP kit alkalmazásával az összes minta metiláltnak mutatkozott, míg az EpC kittel csak 7 plazmában találtunk fokozott metilációs szintet. A vastagbélrákos minták 90%-a volt metilált a HP és az EpC kittel egyaránt (16. táblázat). Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének átlag metilációs szintje a CRC mintákban mind a 4 gén esetében magasabbnak bizonyult a HP kit használata után (5,5%; 1,4%; 4,5% és 22,8%), mint az EpC kittel (2,4%; 0,4%; 0,8% és 14,6%).

5.3.2. A High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit kézi és InviGenius automata skDNS izolálási módszerek összehasonlítása

Kísérletünk során leteszteltünk egy skDNS izoláló automatát, az InviGeniust (I), és eredményeinket összehasonlítottuk a kézi HP kittel kapott paraméterekkel. 27 egészséges, 25 AD és 17 CRC plazmamintában határoztuk meg a szabad DNS mennyiségét és az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációját. A szabad DNS mennyiségének folyamatos emelkedését tapasztaltuk az egészséges – adenóma – karcinóma szekvencia során, valamint megállapítottuk, hogy az skDNS mennyisége enyhén magasabbnak adódott az automatával történő izolálást követően (25. ábra). A legnagyobb DNS össz mennyiséget a késői stádiumú (Dukes C, D) CRC-ben szenvedő betegek esetén tapasztaltunk.



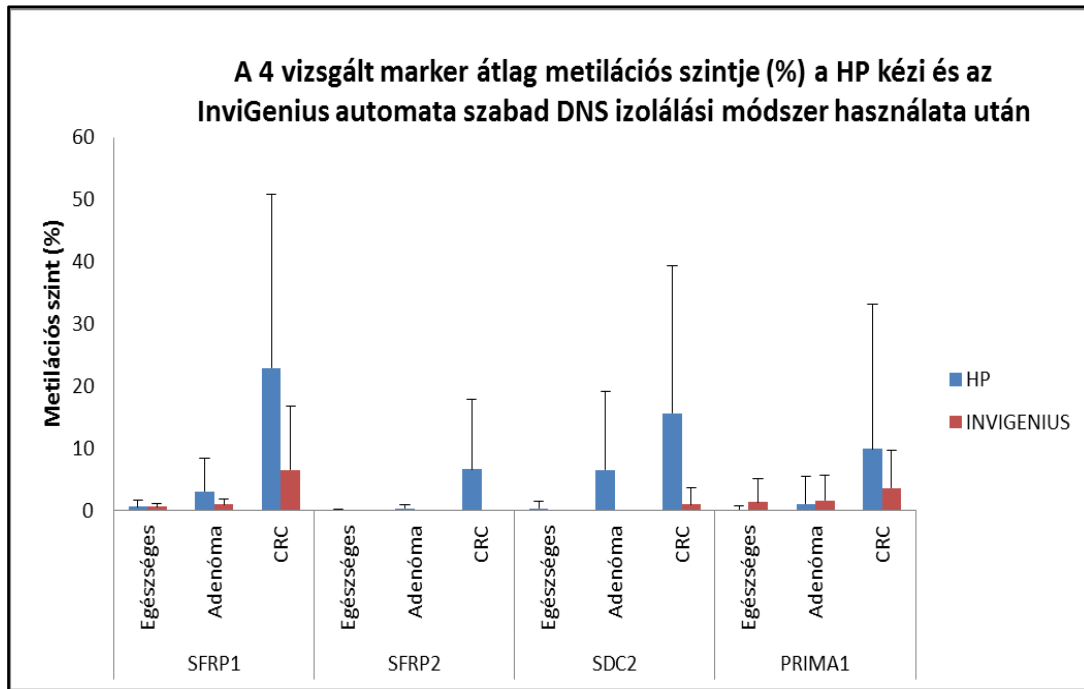
25. ábra. A szabad DNS összmenyisége (3,5 ml plazmából izolálva) manuális (HP) és automata (InviGenius) izolálási módszer használatát követően. Rövidítések: HP – High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit; CRC – vastagbélrák.

A 4 vizsgált marker metilációs gyakoriságának elemzésekor a két módszert összehasonlítva meglehetősen változatos eredményeket tapasztaltunk (16. táblázat). Az *SFRP2* és az *SDC2* gének esetén adenóma mintákban magasabb metilációs gyakoriságot találtunk a kézi izolálást követően, azonban az *SFRP1* és a *PRIMA1* gének esetében az automatával izolált plazmák mutattak magasabb metilációs gyakoriságot. A vastagbél-daganatos betegekből származó plazmamintákban az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* jelzett magasabb előfordulással DNS metilációt a HP kitet használva.

16. táblázat. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációs gyakorisága egészséges, adenóma és CRC mintákban a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (HP) vs. Epi proColon 2.0 Kit (EpC) (A), illetve a HP vs. InviGenius összehasonlításokban (B).

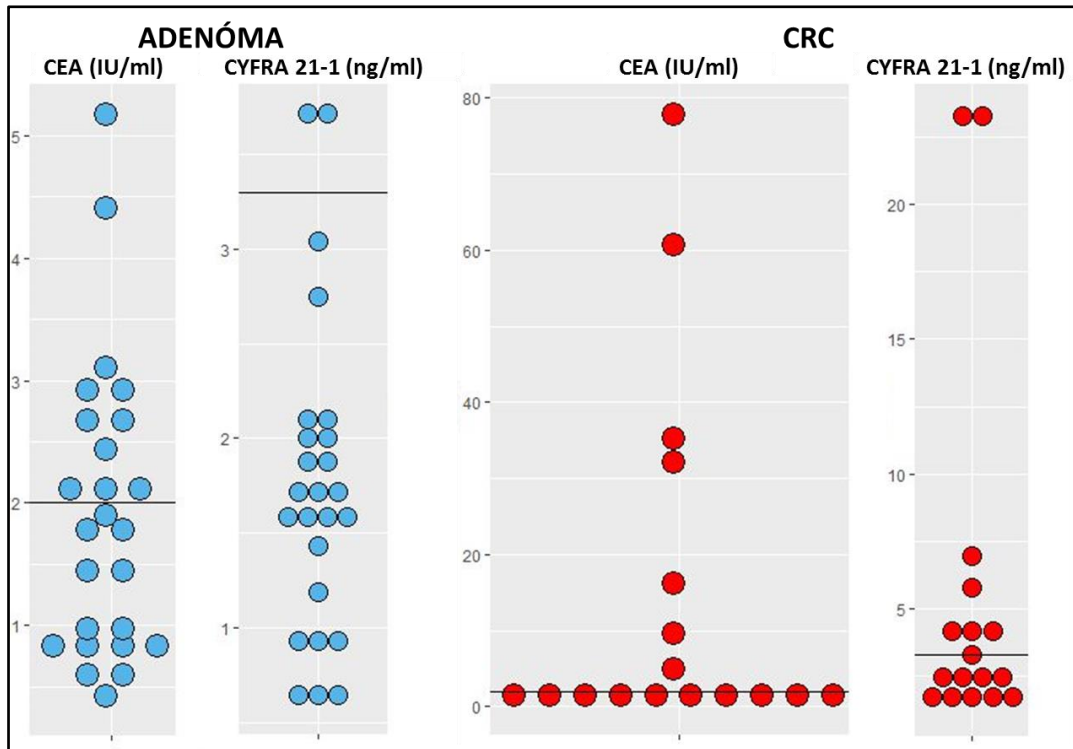
MINTÁK	Metilációs gyakoriság (%)			
	HP	EpC	HP	InviGenius
	SFRP1		SFRP1	
<i>Egészséges</i>	30	30	48	78
<i>Adenóma</i>	100	70	72	88
<i>CRC</i>	90	90	76	82
	SFRP2		SFRP2	
<i>Egészséges</i>	10	0	30	4
<i>Adenóma</i>	50	10	52	0
<i>CRC</i>	90	30	94	6
	SDC2		SDC2	
<i>Egészséges</i>	20	10	11	4
<i>Adenóma</i>	90	30	40	8
<i>CRC</i>	80	50	76	35
	PRIMA1		PRIMA1	
<i>Egészséges</i>	30	40	4	15
<i>Adenóma</i>	100	90	16	24
<i>CRC</i>	70	80	53	47

A 4 gén átlag metiláció szintje (26. ábra) az egészséges mintákban – a PRIMA1 kivételével - 1% alattinak adódott az InviGenius automatával végzett DNS izolálást követően. Adenóma mintákban az *SFRP1*, az *SFRP2* és az *SDC2* magasabb metilációt mutatott a manuális HP kitet használva, CRC mintákban pedig mind a 4 gén nagyobb metilációs szintet mutatott a kézi izolálást követően (24,6%, 6,67%, 16,37% és 9,91%), mint az automata rendszer (24,6%, 6,67%, 16,37% és 9,91%) alkalmazásával.



26. ábra. A 4 vizsgált marker átlag metilációja (%) 27 egészséges, 25 adenóma és 17 CRC plazmamintában manuális (HP) és InviGenius automata izolálási módszer alkalmazását követően. Rövidítések: HP – High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit; CRC – vastagbélrák.

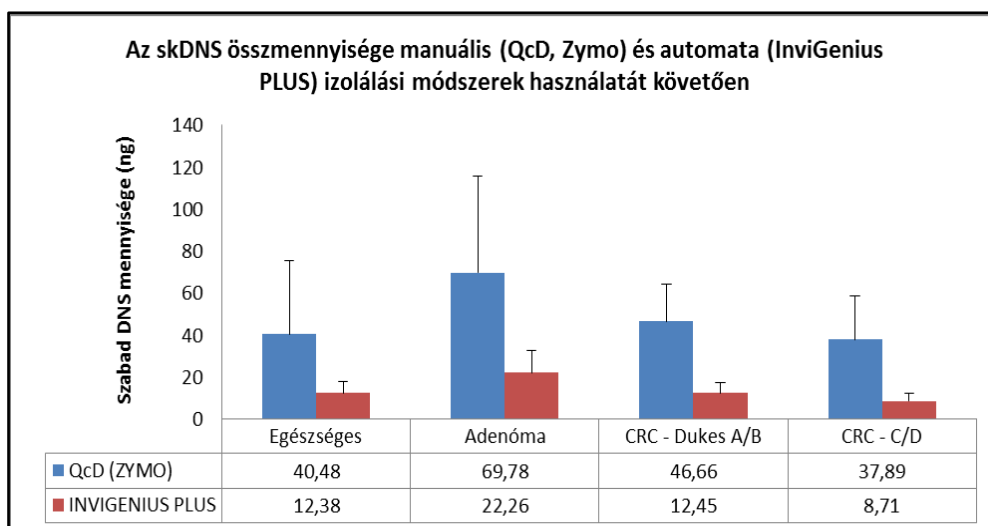
A fenti mintacsoportban (25 AD, 17 CRC) a carcino-embriónális antigén (CEA) és a citokeratin 19 fragmens (CYFRA 21-1) tumor markerek szintjeit is mértük *in vitro* assay-k használatával. A normális érték 0,0-2,0 IU/ml a CEA, illetve 0,0-3,3 ng/ml a CYFRA 21-1 esetében. Emelkedett CEA szintet találtunk az adenómák 44%-ában (11/25) és a CRC minták 71%-ában (12/17). A CYFRA 21-1 szint az adenómás betegek mindössze 8%-ában (2/25) és a vastagbélrákos páciensek 41%-ában (7/17) növekedett meg (27. ábra).



27. ábra. Az adenóma és CRC plazmaminták CEA és CYFRA 21-1 szintje. Rövidítések: CEA – carcino-embriónális antigén; CYFRA 21-2 – citokeratin 19 fragmens; CRC – vastagbélrák.

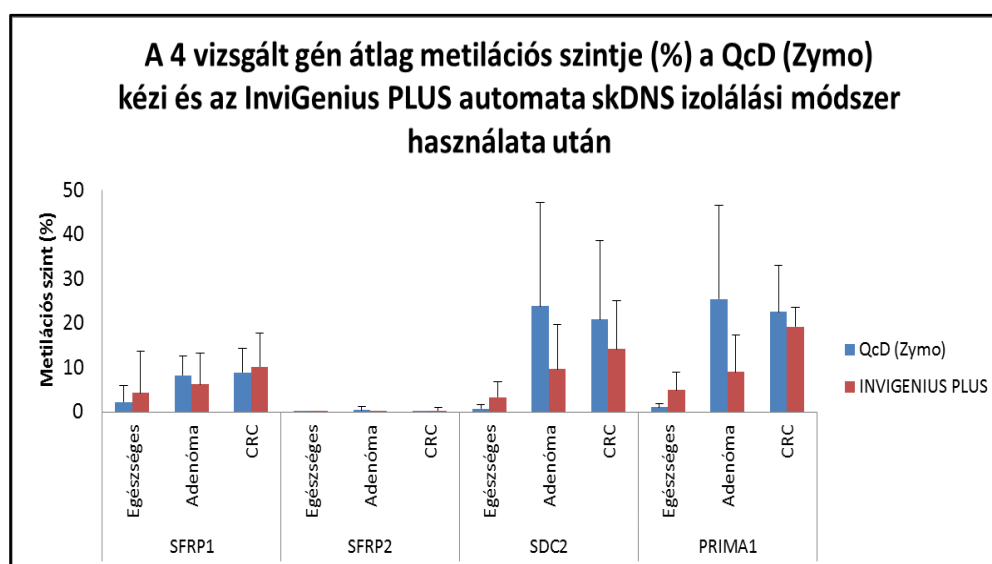
5.3.3. A manuális Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit (QcD, Zymo) és az InviGenius PLUS automata skDNS izolálási módszer összevetése

Vizsgálatunk során két olyan módszert teszteltünk, amellyel nagyobb térfogatú plazmamintából is kivitelezhető az skDNS izolálása: egy oszlop-alapú manuális izolálási módszert, és az InviGenius automata újabb verzióját. A kiindulási plazma mennyisége 4 ml volt mindkét esetben. Minden mintacsoportban magasabb szabad DNS mennyiséget találtunk a manuális kitet használva. Érdekes módon a legmagasabb össz mennyiséget az adenóma mintákban mértük, a rákos minták viszonylag alacsony skDNS mennyiséget mutattak (28. ábra).



28. ábra. Az izolált szabad DNS összmenyisége manuális (QcD, Zymo) és automata (InviGenius PLUS) izolálás használata után. Rövidítések: QcD – Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit; CRC – vastagbélrák.

Az egészséges mintákban a 4 gén metilációs szintje (29. ábra) a kézi izolálás esetén alacsonyabbnak mutatkozott, mint az automata DNS izolálási módszert követően. Adenómás és CRC-s betegek plazmáiban szinte minden esetben magasabb metilációs szintet találtunk a manuális skDNS kinyerést követően, csak az *SFRP1* gén mutatott erősebb metilációt a CRC mintákban az automatát használva. Az *SFRP2* gén esetén izolálási módszertől függetlenül alacsony metilációs arányt tapasztaltunk.

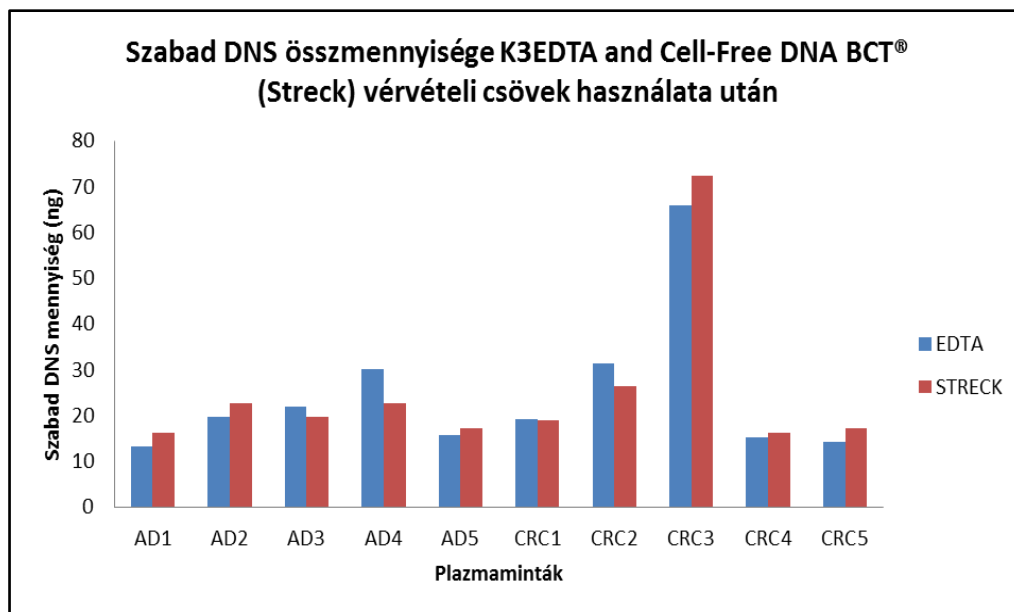


29. ábra. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének átlag metilációs szintje egészséges, adenóma és CRC mintákban kézi (QcD) és automata (InviGenius PLUS)

izolálási módszert követően. Rövidítések: QcD – Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit; CRC – vastagbélrák.

5.3.4. Vértvételi gyűjtőcsövek összehasonlítása: K3EDTA vs. Cell-Free DNA BCT®

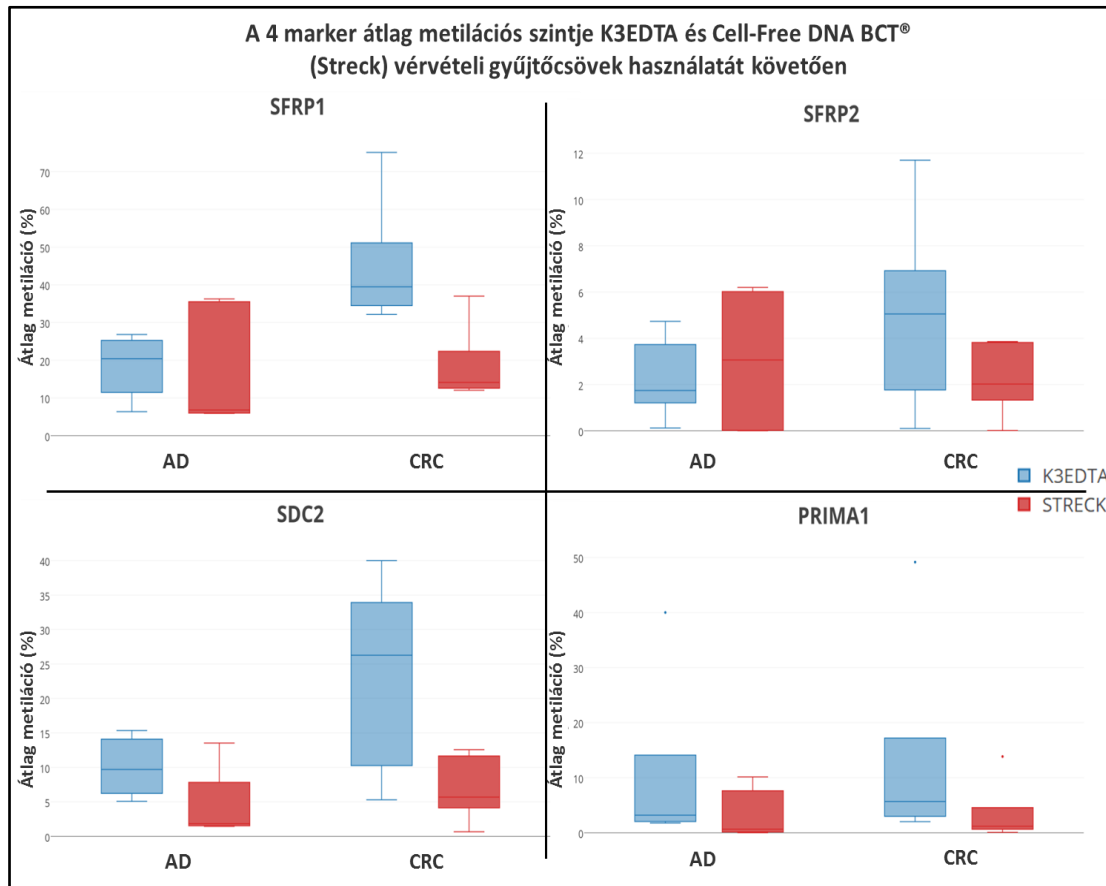
Eddigi megfigyeléseink szerint a szabad DNS mennyiségének és a 4 vizsgált gén metilációs szintjének tekintetében a legmegbízhatóbb DNS izolálási módszernek a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit mutatkozott. A DNS kivonási hatékonyság növelése érdekében leteszteltük a Cell-Free DNA BCT® (Streck) vérvételi csöveket a hagyományos K3EDTA csövekkel összehasonlítva 5 adenóma és 5 CRC mintán. A Streck csöveket azért fejlesztették ki, hogy növeljék a szabad DNS stabilitását a vérvételi időponttól a centrifugálásig eltelt, megnövekedett időtartam esetén is. Ezért a vérmintákból 48 óra elteltével szeparáltunk plazmát, a K3EDTA csövekkel ellentétben, amiket a vérvételt követő 4 órán belül lecentrifugáltunk. A szabad DNS mennyiség tekintetében nem találtunk lényegi különbséget a két gyűjtési mód között ($p=0,86$) (30. ábra).



30. ábra. Az izolált szabad DNS összmenyisége és a 4 gén átlag metilációs szintje két különböző vérvételi gyűjtőcső használata után. Rövidítések: AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

A 4 gén metilációjának szintje nem mutatott jelentős különbséget adenóma mintákban a különböző gyűjtőcsövek használata után, azonban CRC mintákban magasabb metilációs szintet találtunk a K3EDTA csövek alkalmazása során mind a 4 marker esetében. A

különbség az *SFRP1* és az *SDC2* markereknél szignifikánsnak mutatkozott ($p < 0,05$) (31. ábra).



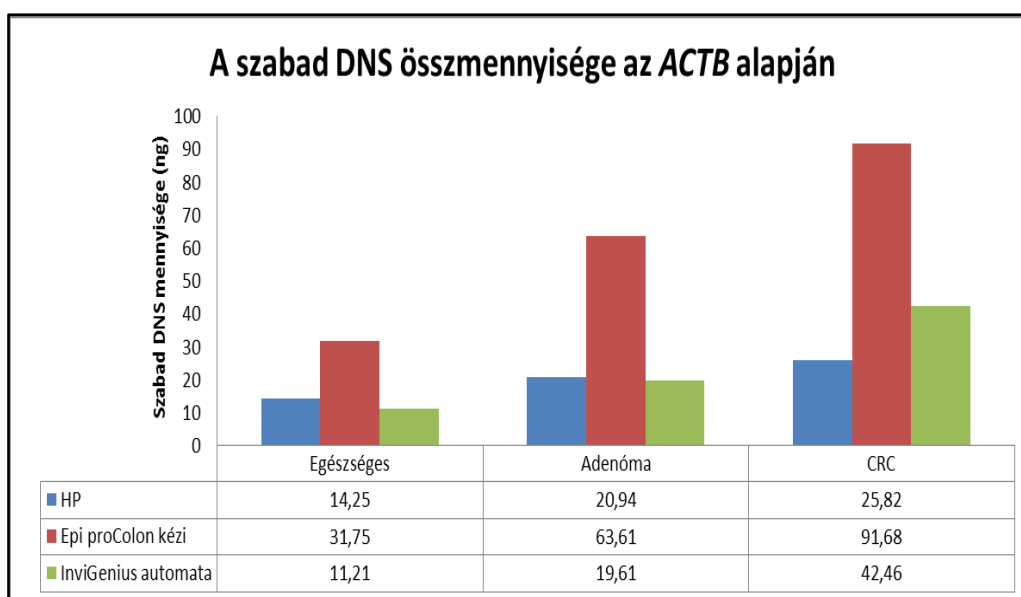
31. ábra. A 4 vizsgált gén átlag metilációjának szintje K3EDTA és Streck vérévételi gyűjtőcsövek használatát követően. Rövidítések: AD – adenóma; CRC – vastagbélrák.

5.4. A Septin 9 gén metilációjának összevetése az *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* gének metilációs szintjével

Kísérletünk során megvizsgáltuk, hogy az Epigenomics cég által kifejlesztett *SEPT9* gén metilációs mintázatán alapuló vastagbélrák szűrő teszt milyen érzékenységgel működik különböző skDNS izolálási módszereket használva. A kit alapját képező Epi proColon kit mellett, a HP oszlop-alapú kézi izolálási módszert, és az InviGenius automatát teszteltük le 10 ép, 10 AD és 20 CRC mintán, majd az értékeket összevetettük az általunk összeállított, 4 gént tartalmazó metilációs panellel.

5.4.1. A szabad DNS mennyisége

Az Epi proColon tesztben a PCR az *ACTB* gén szakaszát is detektálja, ami alapján a szabad DNS mennyiségét is meg tudtuk határozni a különböző izolálási technikákat követően (32. ábra). Egészséges minták esetén az InviGenius automata alkalmazásával kaptuk a legalacsonyabb szabad DNS mennyiség értéket (11,21 ng). Az adenóma mintacsoportban szintén az InviGenius adta a legkisebb össz mennyiséget (19,61 ng), míg a legmagasabb értéket az Epi proColon kittel tapasztaltuk (63,61 ng). A vastagbélrákos páciensek plazmamintáiban szintén az Epi proColon kittel történt izolálást követően figyeltük meg a legnagyobb skDNS mennyiséget (91,68 ng), és a HP kit adta a legalacsonyabb értékeket (25,82 ng).

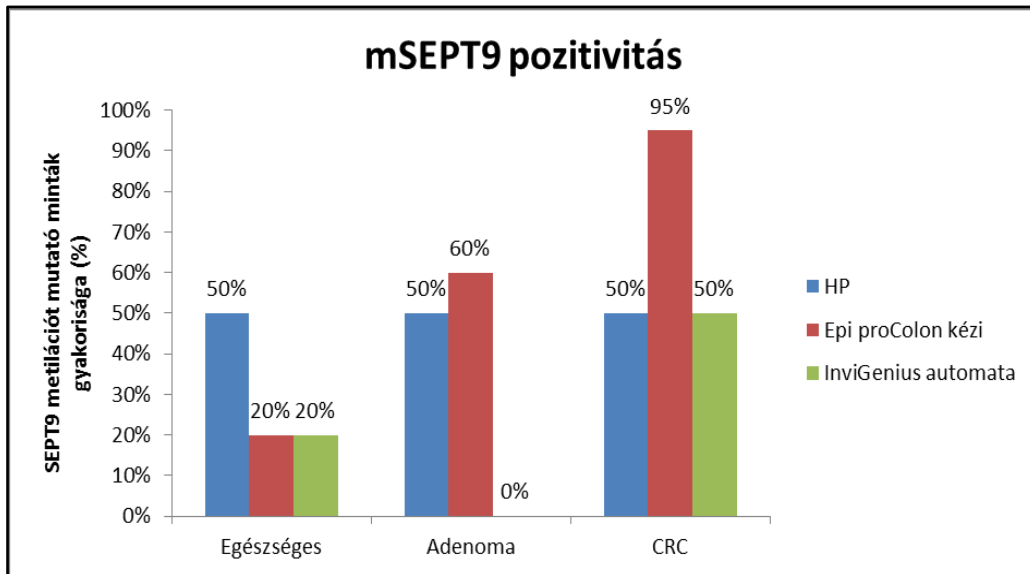


32. ábra. A septin 9 PCR segítségével mért szabad DNS össz mennyiségek az *ACTB* Ct-értékei alapján kalkulálva. Rövidítések: *ACTB* – β -aktin; HP – High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit; CRC – vastagbélrák.

5.4.2. Septin 9 pozitívítás

A *SEPT9* pozitívításra az RT-PCR során kapott Ct-értékekből következtettünk. Az egészséges minták esetén a HP izolálást követően a minták fele, az Epi proColon és InviGenius izolálás után pedig a 10-ből 2-2 minta mutatott *SEPT9* metilációt. A HP kitet alkalmazva az adenómák felében találtunk metilált *SEPT9* gént, míg az automata izolálással egy adenóma minta sem mutatkozott metiláltnak, az Epi proColon kitet használva pedig a 10-ből 6 AD mintában mutattunk ki metilált *SEPT9*-et. A CRC-s betegekből származó plazmamintákat vizsgálva megállapítottuk, hogy az Epi proColon

manuális izolálással a betegek 95%-a kiszűrhető, a másik két módszerrel azonban a rákos mintáknak csupán a fele detektálható (33. ábra).



33. ábra. A metilált septin 9 gén pozitivitása 3 különböző szabad DNS izolálási módszert követően. Rövidítések: mSEPT9 – metilált septin 9; HP - High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit; CRC – vastagbélrák.

A *SEPT9* tesztet az általunk vizsgált génekkel összehasonlítva (5.2.6. fejezet) megállapítottuk, hogy adenóma mintákban mind a 4 marker esetében magasabb szenzitivitás értékeket kaptunk (80% felett), míg a vastagbélrákos minták esetén az Epi proColon tesztéhez hasonló érzékenységet értünk el. A specificitás tekintetében - a *PRIMA1* gén kivételével - nagyobb értékeket kaptunk az általunk vizsgált gének esetében, mint a *SEPT9* teszttel.

6. MEGBESZÉLÉS

A véráramban található sejten kívüli, keringő DNS (skDNS) molekulák mennyiségi és minőségi vizsgálatát napjainkban nagy érdeklődés övezi. Az skDNS koncentrációjának változását különböző betegségekben - beleértve a vastagbélrákot is – számos tanulmány taglalja. Ismert az is, hogy a daganatszövetre jellemző genetikai és epigenetikai változásokat hordozó DNS kikerül a keringési rendszerbe, így ezek a módosulások különböző technikák segítségével vizsgálhatóak. A fentiek tükrében lehetőség nyílt nem invazív, daganat-specifikus diagnosztikai és prognosztikai tesztek fejlesztésére, amelyek nagy segítséget nyújthatnak a klinikai gyakorlatban. A szabad DNS felszabadulásának módjáról, stabilitásáról, illetve degradációjáról azonban keveset tudunk. Nagy az igény magas specificitású és szenzitivitású biomarkerek azonosítására is, amelyek nemcsak a vastagbélrákot, hanem már a rák megelőző állapotokat is jelzik.

PhD munkám során első lépésként a szabad DNS felszabadulásának ütemét elemeztem SHO egér/humán HT-29 kolorektális adenokarcinóma sejt vonal xenograft modellben valós idejű PCR módszerrel. A vizsgálatban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy tumor esetén a véráramban található skDNS frakció mekkora része származik a tumor szövetéből, illetve milyen ütemben kerül a keringésbe. Ezután a DNS degradációjára vonatkozó kísérletet végeztem C57BL/6 egértörzsek felhasználásával, amelyek során egy 3000 bp méretű *in vitro* metilált és nem-metilált DNS szakasz lebomlását vizsgáltam 19 individuális RT-PCR amplikon kimutatásával egészséges és tumoros állatokban.

Miután megállapítottam, hogy a metilált fragmentumok stabilabbak a véráramban, olyan metilációs markerek azonosítását tűztem ki célul, amelyek adenóma és CRC esetén is megbízhatóan mutatják az elváltozást. Előzetes eredményeink és irodalmi adatok alapján 4 potenciális biomarkert (*SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, *PRIMA1*) választottam ki további vizsgálatok céljából. Egészséges, adenómás és vastagbélrákos betegek szöveti és plazmamintáit tanulmányoztam pirosekvenálással illetve MethyLight PCR-rel, valamint eredményeim megerősítésére további methyl capture szekvenálási eredményeket és Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip metilációs adatokat *in silico* elemeztem. A potenciális diagnosztikai alkalmazás elősegítése céljából a plazmából történő marker-kimutatási módszer optimalizálását végeztem. Ezért különböző vérvételi csöveket, valamint kézi és automatizált skDNS izolálási módszereket teszteltem, és a DNS metilációs mintázatra kifejtett hatásukat

tanulmányoztam. A promóter régiókban történő fokozott metiláció a gének expressziójának csökkenéséhez vezet, így a fehérjék kifejeződését is befolyásolja. Kísérleteim során a metilációs mintázat változásának fehérje expresszióra gyakorolt hatását immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltam. Végül az elemzett négy marker megbízhatóságát a kereskedelmi forgalomban kapható *SEPT9* gén metilációján alapuló Epi proColon 2.0 kittel vettem össze. A *SEPT9* metilációját a kézi módszer mellett skDNS izolálásra is használható automata rendszer alkalmazásával is elemeztem.

6.1. A szabad DNS felszabadulásának és stabilitásának vizsgálata

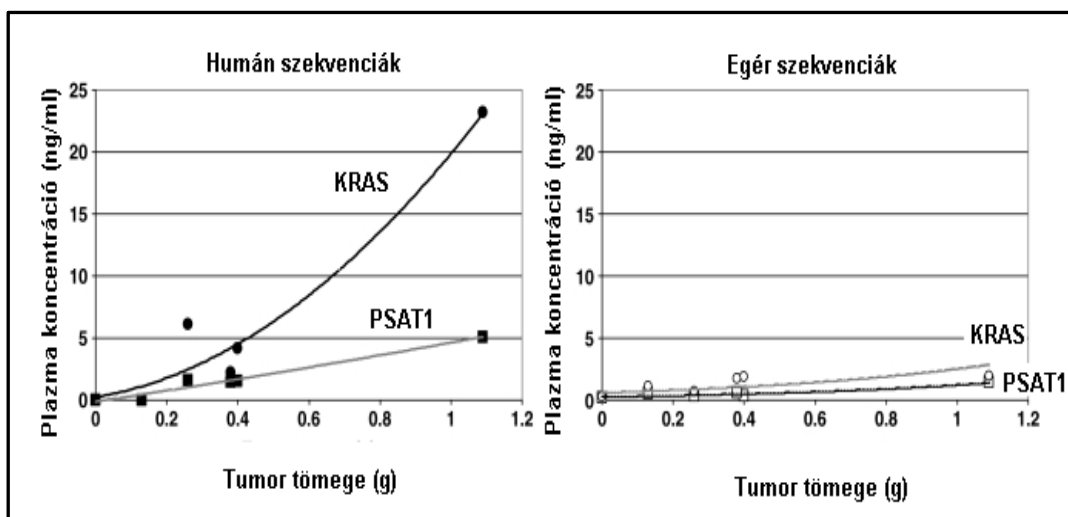
Tumor esetén az skDNS felszabadulása apoptózissal, nekrozissal, vagy direkt szekrécióval is történhet, de a fenti folyamatok pontos részletei még nem ismertek [85]. Az apoptózis és a nekrosis két eltérő formája a sejthalálnak, amelyek magyarázhatják a szabad DNS jelenlétét a vérben. Az apoptózis során a DNS először nagyobb szakaszokra (50-300 kbp), majd kisebb egységekre (180-200 bp) bomlik. Az skDNS méret szerinti eloszlása gélelektroforézis során apoptotikus létrára emlékeztető mintázatot mutat, ami a hiszton-szerkezetre és a nukleoszómák endonukleázokkal szembeni ellenállóságára vezethető vissza. Mindezek mellett a proliferáló daganatsejtek az apoptózis képességét jellemzően elveszítik, így a programozott sejthalál feltehetően csak részben okozhatja a megnövekedett keringő DNS mennyiséget [99, 100]. A nekrosis során szintén különböző hosszúságú DNS darabok kerülhetnek a vérbe, amelyek a széteső (lizáló) sejtekből szabadulnak ki. Azonban több kutatócsoport leírta, hogy a pusztuló sejtek száma és a véráramba jutó DNS mennyisége nincs arányban. Rákos megbetegedés esetén a tumor centrumában elhelyezkedő nekrotizáló tumorsejtekből a DNS molekulák bekerülhetnek a véráramba, ami hozzájárul a magasabb skDNS koncentrációhoz [192-194]. Az skDNS tumorsejtek általi aktív kibocsátása mellett Chen és mtsai. 4 érvet sorakoztatott fel:

- A sugárterápia okozta nagymértékű apoptózis ellenére skDNS koncentráció csökkenés tapasztalható limfóma, tüdő, petefészek, méh és fej-nyaki daganatok esetén (66-90%). Ez arra utal, hogy az skDNS jelentős része a még élő ráksejtekből származik, hiszen a sugárterápia a tumorsejtek proliferációját gátoltja, azaz csökkenti az élő rákos sejtek számát, ami végsősoron alacsonyabb DNS koncentrációhoz vezetne.

- Tumoros sejtkultúrában a nekrotikus és az apoptotikus sejtek száma elhanyagolható, mégis a felülúszóból DNS mutatható ki, valamint a DNS koncentráció növekedése a proliferálódó ráksejtek számával párhuzamos.
- A tumor növekedésével és áttétképzéskor az skDNS szintje emelkedik, ami feltehetőleg a nagy mennyiségű osztódó, és nem az elpusztuló sejteknek köszönhető.
- Normális limfociták polihidroxiálkanoát (PHA), lipopoliszacharid (LPS), illetve antigén kezelés hatására spontán, újonnan szintetizált DNS szálat bocsátanak ki a sejtkultúra médiumba. Ez a jelenség azonban nem egyedülálló, a DNS felszabadulását egyéb egészséges és malignus sejtek osztódása során is megfigyelték [87].

A fentieket összegezve az, hogy a DNS aktív, és nem passzív módon kerül a vérbe kísérletesen még nem bizonyított tény, a gazda DNS, mint lehetséges jelátvivő molekula azonban támogathatja a fenti feltevést [195].

Vizsgálatunk során a tumorból kikerülő skDNS hányadára, és a felszabadulás ütemére voltunk kíváncsiak. Az általunk optimalizált módszer nagy biztonsággal mutat ki 0,1%-nyi humán DNS-t az egér plazmamintákban (13. ábra). Megállapítottuk, hogy a xenograft modellben a humán tumorból származó DNS előrehaladott stádiumban is a teljes szabad DNS mintegy 20%-át teszi ki, ami arányban áll a daganat nagyságával is, mivel a 8. hét végén a tumor mérete az állat testtömegének körülbelül 1/5-ét tette ki. Eredményeink alapján elmondható, hogy a szabad DNS koncentráció megemelkedéséhez a tumoros és az egészséges sejtek tömegarányosan járulnak hozzá (8. és 14. ábra). Ez összhangban áll Thierry és mtsai. megfigyelésével, amely szerint a daganatsejtek által kibocsátott keringő DNS koncentráció a kialakult tumor méretével pozitívan korrelál [92]. Kutatócsoportjuk nude egér/HT-29 xenograft modellel dolgozott, majd humán- illetve egér-specifikus *KRAS* és *PSATI* primerek segítségével kvantitatív PCR-t használva különböztették meg a sejtvonalból és a nude egerekből származó DNS molekulákat. Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a nagyobb tumorral rendelkező egerekben szignifikánsan magasabb volt a tumor által kibocsátott humán DNS koncentrációja. A legkisebb tumorral rendelkező egerekben csak az állat saját sejtjei által kibocsátott skDNS-t mérték, a humán sejtvonalból származót nem tudták kimutatni (34. ábra).



34. ábra. Az skDNS mennyiségének függése a tumor tömegétől. Az ábra Thierry és mtsai. (2010) alapján módosítva készült [92].

Diehl és mtsai. szerint a ráksejtekből származó DNS mennyisége nagymértékben fluktuál, a tumor méretétől függően 0,01%-tól 90%-ig terjedő tartományban [196]. Az is ismert, hogy a DNS mennyisége a betegség progressziójával párhuzamosan folyamatosan emelkedik, majd a sikeres kezelések után egyre csökken, míg visszaáll a fiziológiás szintre [75]. Mindezek alátámasztják eredményeinket, amely szerint a tumor növekedésével fokozódik a humán eredetű DNS mennyisége az egér skDNS frakció mellett, valamint, hogy a plazmából kimutatható szabad DNS mértéke a tumor méretével korrelál. A fenti megfigyeléseket alapul véve a rákos sejtekből felszabaduló DNS vizsgálata széleskörű klinikai alkalmazások kifejlesztésére teremt lehetőséget (17. táblázat).

17. táblázat. A szabad DNS mennyiség változás monitorozásának klinikai alkalmazásai [75].

Klinikai alkalmazások daganat esetén
Korai kimutatás
A betegség molekuláris heterogenitásának kimutatása
A tumor progressziójának nyomonkövetése
Genetikai változékonyság feltérképezése célzott terápia előtt
Kezelés hatékonyságának vizsgálata
Minimális reziduális betegség monitorozása
A rezisztencia kifejlődés mechanizmusának tanulmányozása valós időben

Mikroszkópos vizsgálatunk (15. ábra) szerint a tumorszövet perifériáján – ahol nagy kiterjedésű hajszálér-hálózatot találunk – élő daganatsejtek helyezkedtek el. A tumor centrumában a sejtek elkezdtek pusztulni, mivel az angiogenezis a periféria irányába aktívabb, ezért a szövet közepén elhelyezkedő sejtek általában nem jutnak megfelelő mennyiségű oxigénhez és tápanyaghoz. Feltételezésünk szerint az skDNS egy része a tumor centrumában lévő nekrotizáló tumorsejtekből kerülhet a véráramba.

Az skDNS jelenléte és mennyisége mellett, stabilitását is elemeztem egy 3000 bp méretű *in vitro* metilált és nem-metilált humán DNS szakasz lebomlásának meghatározásával valós idejű PCR alkalmazásával (16. és 17. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy a metilált fragmentumok lassabb degradációval jellemezhetőek, mint a nem-metiláltak, mivel tovább kimutathatók a vérből. Feltehetőleg a metilált DNS-t a DNáz enzimek kisebb határfokkal bontják, az skDNS epigenetikai módosítása miatt megváltozott térszerkezet következtében. Az egészséges és tumoros minták összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a tumoros állatokban lelassul az skDNS degradációja. Ez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy a daganatos betegekben csökken a DNáz enzim aktivitás, ezáltal az injektált DNS szakasz tovább kimutatható [98]. A DNáz enzimek, mint lehetséges rák- és áttétellenes ágensek terápiás alkalmazása napjainkban kezd elterjedni. Patutina és mtsai. egér tumormodellek használatával elemezték a daganatok által kibocsátott szabad DNS és miRNS molekulák áttétképzéshez való kapcsolatát [100]. RNáz A és a DNáz I kezelés máj- és tüdőmetasztázisokra gyakorolt hatásának vizsgálata során megfigyelték, hogy 0,02-2,3 mg/kg DNáz I enzim hatására az áttétek száma szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontroll csoportokhoz képest (0,02 mg/kg mennyiség esetén 9 ± 3 db; 2,3 mg/kg enzim adásakor pedig 18 ± 4 db-ra a kontroll 29 ± 5 db értékhez képest). A tumoros egerekben a szabad DNS koncentrációjának 1,3-szoros emelkedését (131 ± 12 ng/ml) tapasztalták az egészséges C57BL/6 állatokhoz képest (104 ± 7 ng/ml), ami a DNáz I kezelés után a fiziológiás szintre állt vissza (101 ± 16 ng/ml). Metasztázis Inhibíciós Indexet (MII) számoltak a következő képlet alapján: $[(\text{áttétterület-kontroll} - \text{áttétterület-kezelt}) / \text{áttétterület-kontroll} \times 100\%]$. Az áttétes kontroll állatokban, amelyek nem kaptak enzim-kezelést az MII 0%-ot, a metasztázis hiánya 100%-ot jelent. 0,02, illetve 2,3 mg/kg DNáz I enzim adására az MII értéke 45%-ra és 36%-ra ($p < 0,05$) emelkedett, ami jelentős gátlásnak tekinthető [100].

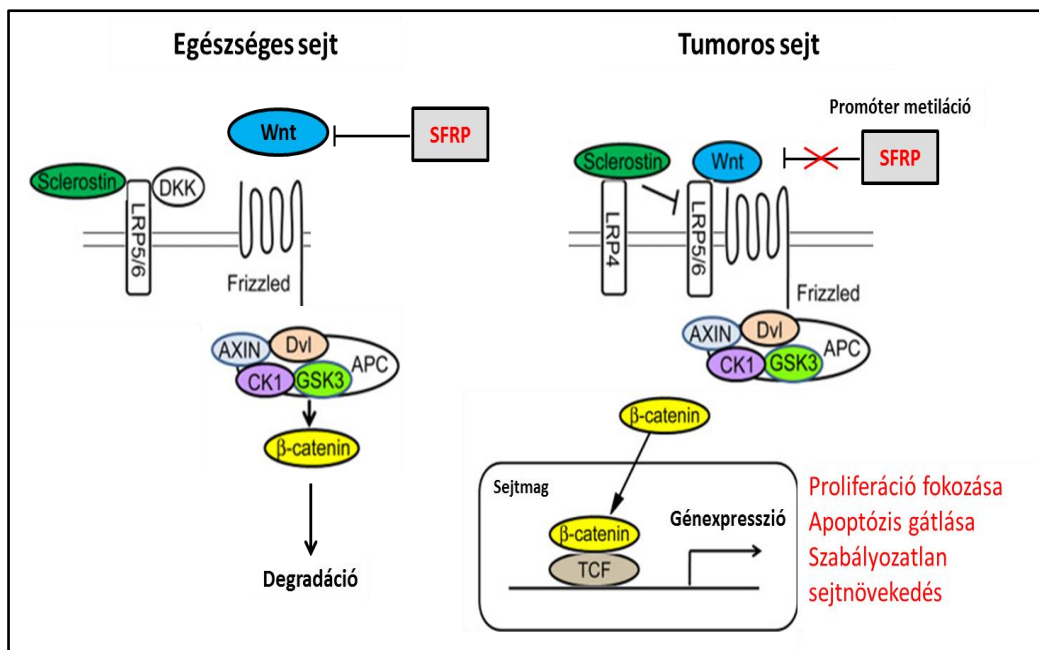
Trejo-Becerril és mtsai. DNáz I és egy proteázokat tartalmazó enzim-keverék (tripszin, kimotripszin, papain) injektálását követően tanulmányozták, hogy az enzimek mennyire befolyásolják a szabad DNS és a szérum proteinek mennyiségét, valamint tumorellenes hatásukat is megvizsgálták különböző állatmodellekben [197]. Egészséges és tumorral oltott Wistar patkányok kezelése után megállapították, hogy a szabad DNS szintje a DNáz I és proteázok együttes alkalmazása esetén csökkent leginkább. Ez arra utal, hogy a szabad DNS nem szabad, hanem lipoproteinekkal asszociált formában, például virtoszómákban van jelen a keringésben. A tumorellenes hatás humán vastagbélrák sejtvonalból (SW480) származó sejtekkel oltott BALB/c nude egereken történt elemzése során megállapították, hogy a DNáz I enzim adása önállóan nem, csak a proteázokat tartalmazó kezeléssel együtt fejtette ki tumorellenes hatását a kezelést követő 21. naptól. 2015-ben egy tanulmánynak sikerült bebizonyítania, hogy egészséges és rákos betegekből származó szabad DNS és kromatin fragmentumok képesek bejutni egér fibroblaszt sejtekbe és rövid idő alatt a sejtmagba is [198]. Ez volt az első tanulmány, amely leírta, hogy a DNS fragmensek, mint mobilis genetikai elemek képesek *in vitro* és *in vivo* integrálódni a genomba. A folyamat azonban DNáz enzim kezelés hatására gátlódik.

6.2. Metilációs markerek vizsgálata humán szövet- és plazmamintákban

A gének promóter régiójában elhelyezkedő CpG helyeken történő fokozott DNS metiláció gyakori jelenség a különböző daganatokban, beleértve a vastagbélrákot is. A tumorsuppresszor gének promóterének hipermetilációja azok csökkent transzkripcióját okozhatja, amely fontos szerepet játszik a tumorok kialakulásában és fejlődésében [199]. Mivel a metilált DNS molekulák a tumor szövetéből bekerülnek a véráramba, valamint kísérleteink szerint a metilált DNS szakaszok stabilabbak is a vérben, a metilált szabad DNS molekulák vizsgálata ideális módszer lehet a daganatok azonosítására és szűrésére [200]. Annak ellenére, hogy a szakirodalomban számos CRC kimutatásra alkalmas metilációs markert leírtak, kereskedelmi forgalomban csak néhány diagnosztikai teszt kapható, mint például a *SEPT9* metiláción alapuló Epi proColon 2.0 kit. Ez a kit nagy érzékenységgel jelzi a kolorektális rák jelenlétét, rákmegelőző adenómákra azonban sokkal kevésbé szenzitív [160, 166, 167]. Kutatócsoportunkhoz hasonlóan, számos más tanulmány is nemcsak egy, hanem több metilációs biomarker megbízhatóságát vizsgálja együttesen [201-203]. Előzetes eredményeink, illetve

irodalmi adatok alapján egy 4 gént tartalmazó panelt állítottunk össze, amelyek metilációjának változását követtük nyomon az ép – vastagbél adenóma – karcinóma szekvencia során. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációs mintázatát plazmaminták mellett, szöveti szinten is vizsgáltuk, és emelkedett metilációt találtunk az elváltozásokban az egészséges mintákhoz képest, amely megfigyelésünket többféle technikával is megerősítettük.

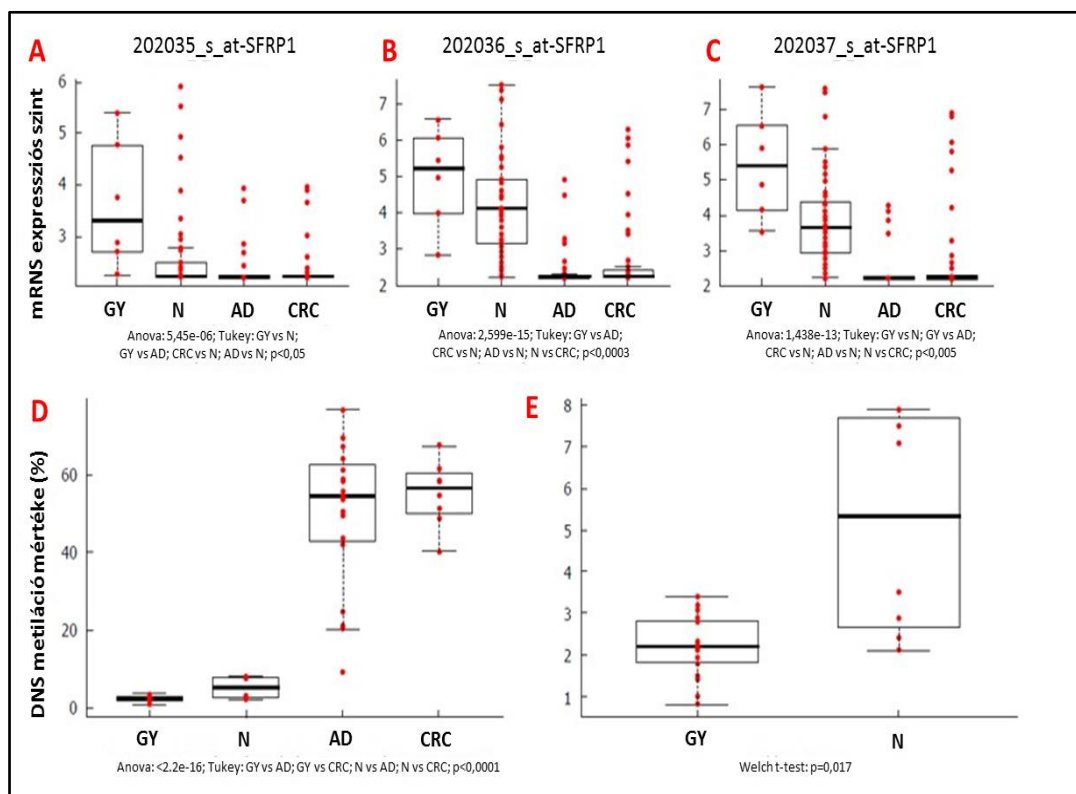
Az *SFRP1* gén egy tumorszuppresszor fehérjét kódol, ami a Wnt/ β -catenin jelátviteli útvonal modulátoraként működik. Tartalmaz egy ciszteinben-gazdag domént, amely homológ a Frizzled proteinek feltételezett Wnt-kötőhelyével (35. ábra). Az *SFRP1* fontos szerepet játszik a sejt növekedésében, az apoptózisban és a differenciáció koordinálásában, így az *SFRP1* gén epigenetikai csendesítése a Wnt/ β -catenin útvonal szabályozatlan aktiválódásához vezet, ami hozzájárul a daganatok kialakulásához.



35. ábra. Az *SFRP1* szerepe a Wnt/ β -catenin jelátviteli útvonalban. Az SFRP1 fehérje az útvonal egyik gátló molekulája, és daganat esetén a gén promóterének fokozott metilációja miatt az SFRP1 fehérje mennyisége lecsökken, ami hozzájárul a jelátviteli út kontrollálatlan aktiválódásához. Ezáltal olyan gének átíródása serkentődik, amelyek hozzájárulnak a daganatok képződéséhez és növekedéséhez. Az ábra Baylin és mtsai. (2006) és Tamura és mtsai. (2016) alapján módosítva készült [204, 205].

Több tanulmány is fokozott *SFRP1* promóter metilációt figyelt meg CRC szöveti minták elemzésekor [149, 206-208]. Kutatócsoportunk korábban az *SFRP1* gén

metilációs státuszának változását friss fagyasztott és formalin-fixált paraffinba-ágyazott (FFPE) szöveti mintákból izolált DNS-en vizsgálta biszulfid-specifikus PCR-t követő HRM elemzéssel [209]. A gén promóter régiója hipermetilációt mutatott a CRC ($55\% \pm 8,4\%$) és az adenóma ($49,9\% \pm 18,1\%$) szöveti mintákban is. Ezzel ellentétben az egészséges vastagbél szövetben alacsony szintű metiláció volt jellemző ($5,2\% \pm 2,7\%$). Az *SFRP1* gén metilációs profilja öregedés során is megváltozik. Gyerekekből (18 év alattiak) származó szövetminták esetén a metiláció szintje $2,2\% \pm 0,7\%$ -nak mutatkozott, ami mérsékelten ugyan, de szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges felnőttek mintáihoz képest ($p=0,017$). A promóter metiláció növekedésével párhuzamosan az *SFRP1* mRNS szint csökkenő tendenciát mutatott a gyermek – egészséges felnőtt – kolorektális adenóma – CRC szekvencia során Affymetrix HGU133 Plus 2.0 (Thermo Fisher Scientific) microarray teljes transzkriptóm adatok alapján (36. ábra).



36. ábra. SFRP1 mRNS expressziójának (A; B; C) és promóter DNS metilációs szintjének (D; E) változása az öregedés során, és az egészséges – kolorektális adenóma – CRC szekvencia mentén. Az SFRP1 mRNS expresszió szignifikánsan csökkent adenóma és CRC mintákban a kontrollokhoz képest mindhárom Affymetrix próbaszett (probe set) esetében. Gyermekmintákban az SFRP1 mRNS szintje magasabb volt, mint

egészséges felnőttekben. Az *SFRPI* promóter régiója szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutatott adenómás és CRC-s betegek szöveti mintáiban, mint a gyermek és az egészséges felnőtt mintákban. Az *SFRPI* promóter erősebben metilált volt a felnőtt mintákban, mint a gyerekekből származó biopsziákban. Rövidítések: GY – gyermek, N – egészséges felnőtt; AD – adenóma; CRC – vastagbélrák. Az ábra Galamb és mtsai. (2016) alapján módosítva készült [209].

PhD munkám során az *SFRPI* promóterében egy 1287 bp méretű CpG-szigetet (chr8:41,308,334-41,309,621; GRCh38/hg38) elemeztem. Illumina HumanMethylation450K metilációs array adatok szerint az összes CpG pozíció, amely szignifikánsan magasabb metilációs szintet mutatott adenóma és CRC mintákban az egészségeshez képest ebben a régióban helyezkedik el. Napjainkig az *SFRPI* DNS metilációs szintjét plazma vagy szérum mintákban csak néhány tanulmányban analizálták [210, 211]. Bedin és mtsai. metiláció-specifikus PCR módszert használtak az *SFRPI* és *OSMR* gének metilációs profiljának meghatározásához [211]. A csoport az adenóma minták 17%-ában (3/18) és a CRC plazmák 63%-ában (44/70) talált fokozott *SFRPI* promóter metilációt, habár szöveti mintákban még magasabb gyakoriságot kaptak (92%; 23/25). Munkánk során ehhez képest a minták nagyobb hányadában tapasztaltunk emelkedett *SFRPI* metilációt az adenómás (89,2%; 33/37) és a CRC-s betegek (85,1%; 40/47) plazmamintáiban egyaránt. Az *SFRPI* hipermetilációját nem csak CRC-ben, hanem más daganattípusokban is leírták, többek között nem-kissejtes tüdőrákban [202], kolangiokarcinómában [212] és myeloma multiplexben [213] változatos metilációs gyakoriságokkal (14%-85%).

Érdekes módon az általunk analizált 4 génből 3 mutatott emelkedett metilációs szintet négy normális kontroll mintában, amelyek közül háromban az *SFRPI* is metilált volt. Az utánkövetés során két páciensről kiderült, hogy krónikus gastritisben szenvednek, kettőt pedig inaktív colitis ulcerosával diagnosztizáltak. Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányban alacsony *SFRPI* metilációs szint növekedést figyelt meg colitises betegekben ($8,16 \pm 12,89\%$) [214], habár gastritis esetén eddig még nem írtak le *SFRPI* hipermetilációt. Eredményeink arra utalnak, hogy a gyulladási betegségek befolyásolhatják bizonyos gének – köztük az *SFRPI* – metilációs mintázatát, a hipotézis megerősítéséhez azonban tovább elemzések szükségesek.

Az *SFRP2* gén terméke szintén az *SFRP* családba tartozó szolubilis fehérje, az *SFRP1*-hez hasonló funkciókkal (35. ábra). Az *SFRP2* gén metilációjának fokozódását CRC-s betegek székletmintáiban több vizsgálat is leírta [215-217]. Egy kutatócsoport az *SFRP2* mellett az *MGMT* gén metilációs státuszát vizsgálta adenómás betegek szérumszövetmintáiban, és pozitív korrelációt figyelt meg a gének metilációs státuszában a különböző mintatípusok között [218]. Zhang és mtsai. plazmamintákban elemezte az *SFRP2*, az *ITGA4* és a *GATA5* gének metilációjának gyakoriságát egészséges, adenómás és CRC-s betegekben [219]. A rákos minták 54,39%-ában, valamint az adenómás plazmák 40%-ában találtak *SFRP2* hipermetilációt. Az előző munkacsoport eredményeihez képest munkánk során jóval magasabb arányban tudtuk kimutatni az AD (83,8%) és CRC (72,3%) mintákat az *SFRP2* metilációjának emelkedése alapján. Az említett kutatócsoport a 3 gén kombinálásával 6,67%-os szenzitivitással és 93,62%-os specificitással tudta elkülöníteni az adenómás betegeket az egészségesektől, míg ezek az értékek CRC esetén 15,79%-nak és 93,62%-nak adódtak. Az általunk vizsgált 4 gén együttesen magasabb érzékenységgel és specificitással azonosította mind az adenómás (89,2%-os szenzitivitás és 86,5%-os specificitás) mind a rákos (91,5% és 97,3%) plazmákat a MethyLight PCR módszert alkalmazva. Ezzel a technikával biopszia mintákban is elemeztük az *SFRP2* metiláció szintjét, és az ép mintákhoz képest szignifikánsan magasabb metilációt tapasztaltunk az adenóma és a tumoros mintákban ($p < 0,05$). Továbbá az ugyanezen a szakaszon elhelyezkedő CpG helyek metilációs státuszát pirosekvenálási adatok felhasználásával is értékeltük, amelynek eredményei szerint mind a 6 CpG pozícióban szignifikánsan nagyobb volt a metiláció szintje az elváltozásokban a kontrollokhoz képest ($p < 0,05$).

A szindekán-2 fehérje egy heparán-szulfát proteoglikán, amely egy hosszabb N-terminális ektodoménból, egy transzmembrán- és egy rövid C-terminális citoplazmatikus doménből épül fel, és a sejtproliferáció, a sejt migráció, valamint a sejt-mátrix interakciók szabályozásában vesz részt [220, 221]. A különböző daganattípusok eltérő *SDC2* expresszióval jellemezhetők. prosztatákban magas szindekán-2 fehérje expressziót figyeltek meg az ép hámphoz képest, ami rossz prognózissal is társult [222], míg oszteosarkóma esetén csökkent kifejeződést írtak le [223]. Chong és mtsai. gyomorrákos betegek szöveti mintáinak elemzése során megállapították, hogy az *SDC2* fokozottan metilálódik a párosított nem-tumoros nyálkahártya mintákhoz képest [224]. Munkánk során pirosekvenálással mutattuk ki az *SDC2* promóter emelkedett

metilációs szintjét adenóma és CRC szöveti mintákban az egészségesekhez képest. *In silico* módszerrel a teljes *SDC2* promóter régiót is tanulmányoztuk a TCGA és GEO adatbázisokból letöltött adatok felhasználásával, és elemzésünk szerint az *SDC2* promóterében elhelyezkedő összes CpG pozícióban fokozódott a metiláció szintje az elváltozásokban a kontroll mintákhoz képest. Ezekre a megfigyelésekre alapozva MethyLight PCR módszerrel is elemeztük a piroszekvenálás módszerrel analizált régió metilációs állapotát először szövet-, majd plazmamintákon. A biopszia minták analízise során megállapítottuk, hogy szignifikánsan emelkedett az *SDC2* DNS metilációs szintje az adenóma és CRC mintákban is az egészségesekhez viszonyítva ($p < 0,05$). A szabad DNS frakcióban az *SDC2* fokozott metilációt mutatott a CRC-s minták 89,4%-ában, (42/47) és az adenómás plazmák 81,1%-ában (30/37). Eredményeink összhangban állnak Oh és mtsai. tapasztalataival, akik 6 gén (köztük az *SDC2*) metilációs státuszát elemezték szöveti és szérumban piroszekvenálással és metiláció-specifikus PCR-rel egyaránt [179]. Tanulmányukban az egyesített szenzitivitást és specificitást 87%-ra és 95,2%-ra becsülték a rákos mintákra, amelyek hasonlóak az általunk kapott 87,2%-os szenzitivitás és 100%-os specificitás értékekhez. Egy másik csoport egy hét génből álló panelt állított össze, amely az *SDC2*-n kívül tartalmazta az *ALX4*, *BMP3*, *NPTX2*, *RARB*, *SEPT9*, és *VIM* géneket, és ezek metilációs szintjét határozta meg plazmamintákban [225]. Az *SDC2* esetén mérsékeltebb eredményeket tapasztaltak, 24%-os érzékenységgel és 94,1%-os specificitással tudták megkülönböztetni a tumoros betegeket az egészséges kontrolloktól.

Az általunk összeállított metilációs biomarker panel negyedik tagja a *PRIMA1* gén, amely fehérjetermékének a feladata az acetilkolin-észteráz (AChE) tetramerekbe rendezése és idegsejtekhez történő kihorgonyozása. A *PRIMA1* alacsony expressziója csökkent AChE aktivitással párosul, ami fokozott kolinerg transzmisszióhoz vezet, amely összefüggésben áll különböző mentális betegségek, többek között a depresszió kialakulásával [226, 227]. Sabunciyani és mtsai. 224 gén metilációs profilját elemezték egészséges és súlyosan depressziós betegek post-mortem frontális agykéreg szövetmintáiban CHARM (Comprehensive High-throughput Arrays for Relative Methylation) microarray és piroszekvenálás módszerekkel [228]. A 17 megerősítésre kiválasztott gén között a *PRIMA1* is szerepelt, és a legmagasabb metilációs szintet mutatta a depressziós betegek mintáiban. Borderline személyiségzavar esetén is kimutatták a gén emelkedett metilációját teljes vér mintákban piroszekvenálással [229].

A metiláció fokozódását különböző daganatokban is leírták, többek között prosztatatarákos betegekből [230], krónikus limfoid leukémiás betegekből [231], illetve vastagbélrákos szövetmintákban is [149]. Mai ismereteink szerint tanulmányunk az első, amely a *PRIMA1* gén metilációs szintjét jó és rosszindulatú vastagbél-daganatos betegek plazmamintáiból izolált szabad DNS frakcióban vizsgálta. Emelkedett metilációt találtunk az adenómás betegek 70,3%-ában és a CRC-s plazmák 80,9%-ában. A *PRIMA1* átlag metilációja egészséges szövetekben 1,6%-osnak, míg CRC esetén 57,7%-osnak adódott MethyLight PCR-t használva. Ezek az értékek ugyanazon páciensek plazmamintáiban 0,8%-osnak és 16,9%-osnak mutatkoztak. Szöveti mintákban a teljes *PRIMA1* promóter régió *in silico* vizsgálata során megállapítottuk, hogy a 11 CpG pozíció közül 10 szignifikánsan magasabb metilációs fokkal jellemezhető CRC esetén a normális mintákhoz képest ($p < 0,05$). Ezek a megfigyelések korrelálnak munkacsoportunk korábbi, független biopsziás mintákon kapott eredményeivel, amelyek szintén *PRIMA1* promóter metilációs szint emelkedést mutattak vastagbélrákos betegekből [149].

Munkánk során tehát létrehoztuk a fenti négy génből álló potenciális biomarker panelt, amely a szakirodalomban napjainkig közölt adatoknál magasabb szenzitivitással és specificitással képes elkülöníteni az adenóma és CRC plazmamintákat az egészséges kontrolloktól, a markerek promóter metilációs szintje alapján. A 18. táblázat foglalja össze azokat a korábbi vizsgálatokat, amelyek a szabad DNS frakcióban vizsgálták a 4 kiválasztott gén valamelyikének metilációs státuszát vastagbél betegségek esetén. A plazmaminták elemzése során tett megfigyeléseinket nagyszámú független mintahalmazon végzett *in silico* vizsgálataink is megerősítették. A MethyLight PCR-rel elemzett szakaszokkal átfedő DMR-ek (eltérően metilálódott régiók), és a teljes promótereken elhelyezkedő CpG helyek metilációs fokának vizsgálatával is a panel géneinek emelkedett metilációs szintjét tapasztaltuk az elváltozásokban a kontroll mintákhoz képest.

18. táblázat. A szabad DNS frakcióban általunk vizsgált gének metilációs szintjét elemző tanulmányok vastagbél betegségek esetén.

Gén neve	Munkacsoport	Év	Minta-típus	Betegcsoportok			Referencia
				Egészséges	Adenóma	CRC	
SFRP1	Lyu és mtsai.	2014	szérum	59	-	59	[207]
SFRP1	Bedin és mtsai.	2017	plazma	56	22	114	[208]
SFRP2	Zhang és mtsai.	2015	plazma	47	30	57	[219]
SFRP2	Naini és mtsai.	2016	szérum	25	25	-	[218]
SDC2	Oh és mtsai.	2013	szérum	125	-	131	[179]
SDC2	Rasmussen és mtsai.	2017	plazma	102	-	193	[225]

A kereskedelmi forgalomban kapható Cologuard® teszt bizonyos gének aberráns metilációs és mutációs státuszát elemzi székletmintákban. Egy 10.000 résztvevővel készült klinikai vizsgálat kimutatta, hogy a teszt a CRC mintákat 92,3%-os és az előrehaladott rákelőző állapotokat 42,4%-os szenzitivitással képes azonosítani [74]. A teszt érzékenysége disztális léziók esetén magasabb volt (54,5%-os), mint proximális elváltozásokban (33,2%-os). Az általunk kialakított marker panel a fenténél nagyobb megbízhatósággal különíti el az adenómákat (89,2%-os szenzitivitás, 86,5%-os specificitás) a kontrolloktól, CRC esetén pedig a Cologuard® széklet-alapú teszthez hasonló érzékenységet (91,5%) állapítottunk meg.

A gének promóter régiójában bekövetkező DNS metilációs szint emelkedésének fehérjék expressziójára gyakorolt hatását immunhisztokémiai vizsgálatokkal tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az egészséges – kolorektális adenóma – karcinóma szekvencia során mind a 4 vizsgált marker esetében csökken a fehérjék kifejeződése, ami megerősíti feltevésünket, miszerint a fokozott promóter DNS metiláció gátolja az mRNS-ek átíródását, ezáltal a fehérjék szintjét is lecsökkenti.

6.3. A szabad DNS izolálási módszerek hatása a DNS metilációs vizsgálatokra

PhD munkám során, miután nagy mintaszámú csoportokat vizsgálva megállapítottuk, hogy az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének fokozott metilációt mutatnak

adenóma és CRC plazmamintákban, célul tűztük ki különböző vérvételi csövek, és izolálási módszerek alkalmazásának összevetését. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy az eltérő technikák mennyire befolyásolják a szabad DNS mennyiségét és metilációs mintázatát, ami hatással lehet a módszerünk betegség-kimutatói hatékonyságára. A hagyományos K3EDTA gyűjtőcsövek mellett kipróbáltuk a Streck cég által forgalmazott Cell-Free DNA BCT® vérvételi csöveket is [189]. A Streck csövet az skDNS stabilitásának megőrzése céljából fejlesztették ki, amelynek köszönhetően a szabad DNS szobahőmérsékleten intakt marad akár 14 napon át, így lehetővé teszi a minták kényelmes gyűjtését, szállítását és tárolását. A cső formaldehidmentes tartósító reagenseket tartalmaz, amelyek megakadályozzák a DNS nukleázok általi lebomlását, valamint gátolják a genomiális DNS kiszabadulását a véráramban található sejtekből. Öt AD és 5 CRC mintát gyűjtöttünk Streck és K3EDTA csövekbe párhuzamosan, majd megállapítottuk, hogy a különböző vérvételi csövek nem befolyásolják jelentősen a szabad DNS mennyiségét. A Streck csőben gyűjtött minták 60%-ában (6/10) találtunk magasabb skDNS össz mennyiséget. Kang és mtsai. hasonló vizsgálatokat végeztek, kiegészítve a CellSave gyűjtőcsővel, és emlődaganatos betegek plazmamintáiban mérték meg a szabad DNS és a genomiális DNS mennyiségét [232]. A csöveket 4°C-on és szobahőmérsékleten tárolták 2, 6 és 48 órán keresztül, majd ezután szeparálták a plazma frakciót. Megfigyelésük szerint a szabad DNS 6 órás inkubálást követően is stabil marad függetlenül a gyűjtőcső típusától, azonban hosszabb tárolás esetén (például elhúzódó mintafeldolgozási idő esetén) érdemes a Streck csöveket alkalmazni, elsősorban szobahőmérsékleten történő tárolással. A Streck csövekben gyűjtött plazmaminták szabad DNS tartalmát elemző más tanulmányok is hasonló eredményekről számoltak be [233-235]. A hasonló szabad DNS mennyiséggel ellentétben azt tapasztaluk, hogy a különböző vérvételi csövek alkalmazása jelentősen befolyásolja a szabad DNS metilációs mintázatát. Eredményeink szerint a hagyományos K3EDTA csövekben gyűjtött CRC mintákban magasabb metilációs szintet találtunk mind a 4 vizsgált gén esetében, és a különbség az *SFRP1* és az *SDC2* markerek esetében szignifikánsnak bizonyult. A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a szabad DNS stabilitásának megőrzésére alkalmas a Streck cső, azonban, ha vizsgálatunk célja az skDNS metilációs mintázatának elemzése, a Streck vérvételi cső befolyásolja annak mértékét, ezért – a teszt magas érzékenységének megőrzése miatt – érdekesebb a hagyományos K3EDTA csövet alkalmazni.

A diagnosztikai és prognosztikai tesztek fejlesztésénél a minták egységes, egyszerű gyűjtésén és tárolásán kívül az automatizáció is fontos szempont, ami elősegíti a teszt klinikai alkalmazását. Ezért a különböző vérvételi csöveken kívül teszteltünk három különböző kézi és két automata szabad DNS izolálási módszert is, amelyek között szilika-membrán alapú oszlopos DNS izolálás és mágneses gyöngyhöz történő DNS kötésen alapuló módszer egyaránt volt. Elsőként a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kitet (HP) és az Epi proColon 2.0 (EpC) manuális izolálási módszereket hasonlítottuk össze. Az Epi proColon 2.0 kitben a szabad DNS izolálása és az azt követő biszulfid konverzió szorosan kapcsolott, így a protokoll szerint nem tartalmaz skDNS mennyiség meghatározási lépést. A kit a *SEPT9* gén metilációjának mérésére fejlesztett teszt, de alkalmas egyéb markerek elemzésére is, például Schmidt és mtsai. a *SHOX2* gén metilációs státuszát határozták meg az Epi proColon 2.0 kit használatával nem-kissejtes és kissejtes tüdőrákos betegek plazmamintáiban [236]. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációs elemzése során megállapítottuk, hogy a HP kitet használva a metilált adenóma minták száma magasabb volt, mint az EpC kit alkalmazása után, és két gén esetében magasabb metilációs gyakoriságot találtunk a CRC minták között is. Továbbá a HP kitet használva mind a négy gén átlag metilációs szintje is nagyobbak mutatkozott a vastagbélrákos betegek plazmáiban. A két módszer használatából adódó metilációs különbségek okai nem tisztázottak, de feltehetően a szabad DNS megkötésének eltérő módszere miatt alakultak ki.

Az Epi proColon 2.0 kitet az InviGenius automata szabad DNS izoláló protokolljával is összehasonlítottuk. Az InviGenius és tovább fejlesztett változata, az InviGenius PLUS gép párhuzamosan 12 plazmamintából képes kinyerni és tisztítani a szabad DNS frakciót, valamint a biszulfid konverziós lépés elvégzésére is alkalmas – többek között – az Epi proColon 2.0 kit segítségével. A kiindulási plazma mennyisége 4 ml-ig növelhető, és a DNS molekulák megkötése mágneses gyöngyök segítségével történik mindkét készülék esetén. Az automatákkal történt DNS kivonást követően az skDNS koncentráció mérése is beiktatható a protokollba. Méréseink szerint a HP kézi izoláláshoz viszonyítva az automatával magasabb szabad DNS mennyiséget tudtunk kinyerni a plazmamintákból. Fleischhacker és mtsai. két manuális (QIAamp DNA Blood Mini Kit és NucleoSpin Plasma F Kit) és egy automata skDNS kinyerési módot tesztelt többféle daganatos beteg plazmamintáin [237]. Vizsgálatuk során a MagnaPure™ LC (Roche Life Science) automata rendszert használták, és a kiindulási

plazma mennyisége 1 ml volt minden esetben. Az skDNS összemennyiségét három target szekvencia (endogén retrovírus – ERV; GAPH gén; β -globin) alapján valós idejű PCR segítségével kvantifikálták. Eredményeik azt mutatták, hogy az automatikus izolálással nagyobb mennyiségű szabad DNS-t lehet kinyerni a manuális módszerekhez képest. Egy másik kutatócsoport a sejten kívüli magzati DNS volument elemezte kézi és gépi DNS kinyerést követően, és 40,7%-kal több DNS-t tudtak izolálni az automatával, mint manuálisan [238]. Annak ellenére azonban, hogy a DNS kivonása hatékonyabb az automata rendszerekkel, megfigyeléseink szerint befolyásolják a metilációs mintázatot. A MethyLight PCR vizsgálatok eredményei alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált markerek átlag metiláció szintje és gyakorisága is a kézi izolálást követően mutatkozott magasabbnak.

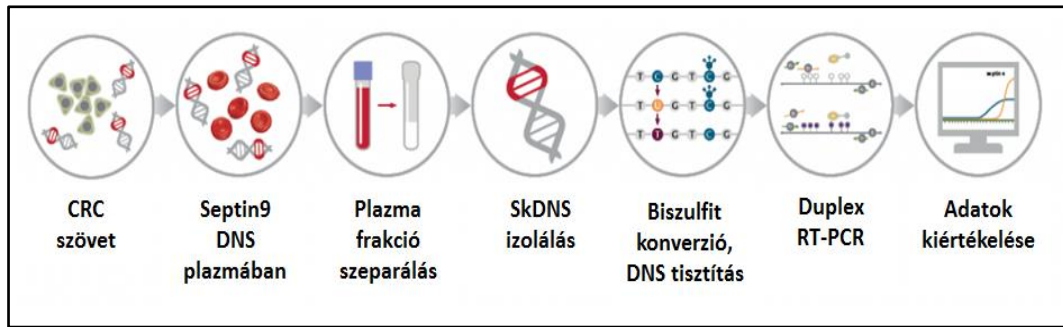
Az InviGenius fejlesztett változatát, az InviGenius PLUS-t egy oszlopos tisztításon alapuló Zymo Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kittel (QcD) vetettük össze. Ebben az összehasonlításban a kézi izolálás adott magasabb szabad DNS mennyiséget, a HP kithoz viszonyítva azonban kisebb kihozatalt tapasztaltuk. A metilációs mintázatot elemezve megállapítottuk, hogy az *SDC2* és a *PRIMA1* gének nagyobb metilációs százalékokat adtak a Zymo protokollal történt DNS izolálást követően adenóma és CRC mintákban is, míg az *SFRP1* esetében a manuális és az automata izolálás esetén egyaránt hasonló értékeket kaptunk. Az *SFRP2* gén mindkét módszerrel alacsony metilációs szintet mutatott. Eredményeink arra utalnak, hogy nem csak a manuális és automata szabad DNS izolálási módszerek adnak eltérő eredményeket a metiláció mértékét tekintve, hanem a különböző kézi izolálási protokollok is befolyásolják a metilációs mintázat kimutatásának hatékonyságát.

6.4. A metilációs panel hatékonyságának összevetése egyéb nem invazív módszerekkel

Munkánk során összevetettük az általunk kialakított, négy gént tartalmazó metilációs panel érzékenységét és fajlagosságát egyéb, nem invazív szűrőmarkerekkel. Elsőként 25 adenóma és 17 CRC plazmamintát magában foglaló mintacsoportban mértük meg a CEA és CYFRA 21-1 szinteket. A CEA egy sejt felszíni glikoprotein, amely a fetális colonban és a vastagbél-daganatban is kimutatható, azonban egészséges felnőttekben nem [239]. Emelkedett értékét a vastagbélrák mellett hasnyálmirigy-, gyomor-, tüdő- és emlődaganatokban is megfigyelték [240]. Kísérletünk folyamán az adenóma minták

44%-ában és a CRC minták 71%-ában találtunk a fiziológiás szintnél magasabb CEA szintet. Wang és mtsai. retrospektív vizsgálatukban 310 vastagbélrákos páciens CEA szintjét vizsgálták meg, és a betegek 54,84%-ában (170/310) tapasztaltak kóros CEA mennyiséget [241]. Tanulmányukban a CEA szint mellett a cancer antigén 19-9 (CA19-9) és a cancer antigén 242 (CA242) tumor markereket is elemezték. Utóbbi két marker kevésbé szenzitív, mint a CEA, ezért ezeket jórészt egyéb jelzőfaktorokkal kombinálva használják. A 3 marker együttesen a CRC minták 71,61%-át jelezte, és megnövekedett szintjük pozitívan korrelált a betegek életkorával ($p=0,006$) és a tumor stádiumával (AJCC stádium, $p=0,001$). Azt is kimutatták továbbá, hogy a fenti 3 marker magas szérumszintje szignifikánsan csökkenti a betegségmentes túlélési időt (disease-free survival – DFS). Vizsgálatunkban feltehetően a rendelkezésünkre álló kis mintaszám miatt nem találtunk korrelációt a CEA szintje és különböző klinikopatológiai változók között. A CEA mellett a CYFRA 21-1 szintet is megmértük az adenómás és CRC betegek mintáiban, és jóval kisebb szenzitivitást kaptunk, mint a CEA esetén. Mindösszesen az adenómás páciensek 8%-ában (2/25) és a CRC-s betegek 41%-ában (7/17) tapasztaltunk CYFRA 21-1 szint növekedést. Ezt a markert elsődlegesen tüdő-, húgyhólyag- és fej-nyaki daganatok esetén használják markerként, de szintje CRC esetén is megemelkedhet, azonban kisebb gyakorisággal, mint a CEA [242]. Thomas és mtsai. a CYFRA 21-1, a CEA és a cancer antigén 125 (CA125) szinteket elemezték vastagbél-daganatos betegekben, és megállapították, hogy sem a CYFRA 21-1, sem a CA125 szintje nem változik szignifikánsan az ép kontrollokhöz képest, és kombinált használatlaltal sem növelték a CEA marker érzékenységét [243]. Látható tehát, hogy az elemezett két tumor marker kisebb érzékenységgel a tumoros és az adenómás betegek mintáiban egyaránt, mint az általunk összeállított epigenetikai markereket tartalmazó panel. További vizsgálataink során a mintaszám növelésével célunk összefüggéseket találni elsősorban a CEA marker szintje és a különböző klinikopatológiai jellemzők között, valamint a metilációs markerekkel kombinálva ezt tovább fokozni a betegség kimutatásának hatékonyságát.

Vizsgálataink során a kereskedelmi forgalomban is kapható vastagbélrák-specifikus, folyadék biopsziából kimutatható *SEPT9* metilációs marker érzékenységét is összevetettük a panelünkkel. Az FDA-engedéllyel rendelkező Epi proColon 2.0 teszttel a septin 9 gén metilációs státuszát lehet vizsgálni. A módszer biszulfid-konverziós módosításon alapszik, amit egy duplex PCR követ (37. ábra).



37. ábra. Az Epi proColon 2.0 teszt működési elve. A tumor szövetében bekövetkező *SEPT9* metiláció kimutatható a véráramba kerülő szabad DNS frakcióból. A plazmából történő DNS izolálást és biszulfid-konverziót követően duplex valós idejű PCR segítségével állapítható meg egy minta *SEPT9* pozitivitása. Az ábra forrása: www.epiprocolon.com, módosítva.

Kísérletünk folyamán egészséges, adenómás és vastagbélrákos páciensektől gyűjtöttünk plazmamintát, majd a szabad DNS előkészítését a duplex PCR-hez háromféle módszerrel végeztük. Az Epi proColon 2.0 kitben található Epi proColon Plasma Quick Kitet manuálisan és az InviGenius automatával is alkalmaztuk. A kit a plazmából történő skDNS izoláláshoz és biszulfid-konverzióhoz szükséges reagenseket egyaránt tartalmazza. Viszonyítási alapunk az előzőekben leghatékonyabbnak bizonyult High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (HP) szabad DNS extrakciós módszer volt. A *SEPT9* pozitívitas megállapítása egységesen az Epi proColon 2.0 kit részeként vásárolható Epi proColon Sensitive PCR Kittel történt. A PCR során ezzel párhuzamosan a β -aktin (*ACTB*) háztartási gén egy adott régióját is detektáljuk, így a teljes biszulfid konvertált DNS állomány mennyiségét is megkapjuk. Az irodalmi adatoknak megfelelően az egészséges – adenóma – karcinóma szekvencia során növekedő szabad DNS mennyiséget tapasztaltunk mind a három izolálási módszerrel [98, 99, 244]. A legnagyobb skDNS koncentrációt a β -aktin mérése alapján a kézi Epi proColon Plasma Quick Kittel kaptuk, az automata és a szilika-membrán alapú oszlopos HP izolálással hasonló mennyiségeket figyeltünk meg.

A *SEPT9* metilációs markert vizsgálva a manuális Epi proColon 2.0 kittel az egészséges minták 20%-a, az adenómák 60%-a és a CRC minták 95%-a bizonyult m*SEPT9* pozitívnak. Az InviGenius automatával azonban nem találtunk metilált septin 9-et mutató adenóma mintát, és a CRC-s plazmáknak is csak a felében tapasztaltunk m*SEPT9* pozitívítást. Megállapítottuk továbbá, hogy a HP kit nem alkalmas az Epi

proColon teszt előtti előkészítésre, hiszen minden mintacsoportban az esetek felében észleltünk mSEPT9 pozitivitást. Az Epi proColon 2.0 kézi izolálással kapott eredményeink korrelálnak a szakirodalomban található korábbi adatokkal, amelyek szerint a teszt érzékenysége CRC esetén 90% körüli, azonban adenóma stádiumokban kissé alacsonyabb [164, 166, 245]. Song és mtsai. vizsgálatukban az adenómákat a szövettani típusuk, illetve a diszplázia foka szerint csoportosították [245], és megállapították, hogy a fogazott adenómák mindössze 27,8%-a, és a tubulovillózus adenómák 53,7%-a mutatott metilált *SEPT9*-et. Az enyhén diszplasztikus adenómák 47%-ban, míg a súlyosan diszplasztikusak 62,5%-ban bizonyultak mSEPT9 pozitívnak. Összevetve a *SEPT9* teszt Epi proColon 2.0 kézi kittel mutatott szenzitivitását az általunk vizsgált négy metilációs markerrel, megállapíthatjuk, hogy adenóma minták esetén - a *PRIMA1* gén kivételével – markereink nagyobb érzékenységgel képesek elkülöníteni az adenomás mintákat az egészségesektől. Adenomás minták esetén a négy marker összesített szenzitivitása 89,2%-os, ami jelentősen magasabb, mint a *SEPT9* teszt adenóma kimutatási hatékonysága mind az általunk a *SEPT9* teszt esetén kapott 60%-os szenzitivitás, mind a korábbi irodalmi adatok alapján.

A CRC-s minták esetében a 4 metilációs marker együttes szenzitivitása 91,5%-nak adódott, ami a *SEPT9* teszthez hasonló eredmény. Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint az adenomás betegekből származó plazmák 30,8%-a, valamint a vastagbélrákos betegek plazmamintáinak 88,2%-a (30/34) bizonyult mSEPT9 pozitívnak [167]. A tanulmányban párosított biopszia mintáknak is elemezték a metilált *SEPT9* szintjét, és azt találták, hogy a plazmamintákkal ellentétben, szövet esetén adenóma mintákban is kimutatható a *SEPT9* fokozott metilációja (100%). Vizsgálataink során szintén elemeztük az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* gének metilációs szintjét párosított szöveti mintákon is, MethyLight PCR módszerrel és *in silico* analízissel egyaránt. Eredményeink korrelálnak Tóth és mtsai. megfigyeléseivel, amely szerint szöveti mintákban a metiláció foka magasabb értékeket ér el, mint plazmamintákban. Ennek hátterében az állhat, hogy az elváltozásokban bekövetkező fokozott DNS metiláció a szövetben koncentráltan van jelen, azonban mikor a metilált DNS molekulák kikerülnek a véráramba, a nagy mennyiségű más szövetekből származó 'hátér' DNS miatt felhígul a jelenlétük. Továbbá a DNS-szalakat a vérben található DNáz enzimek is bontják, így a metilált DNS szakaszok a véráramban jóval kisebb mennyiségben találhatók meg, mint magában a szövetben. Az általunk kialakított

kétlépéses MethyLight PCR módszernek köszönhetően azonban a metilált szakaszok célzottan és feldúsítva elemezhetők, így a metiláció mértéke pontosabban mérhető az adott DNS fragmentumban. Az Epi proColon 2.0 teszt ezzel ellentétben egy lépéses PCR-rel működik, részben ennek köszönhető, hogy a metilált *SEPT9* génszakaszt adenóma mintákban alacsony hatékonysággal képes csak kimutatni. Ezenkívül egy több gént tartalmazó biomarker panel a diagnózishoz és prognózishoz szükséges érzékenyebb és specifikusabb információkat biztosíthat, mint az individuális markerek.

6.5. Legfontosabb új megállapítások

- SHO egér/HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma xenograft modellen történő vizsgálataim során megállapítottam, hogy a tumorsejtekben található humán-eredetű szabad DNS bekerül a véráramba, és mennyisége folyamatos emelkedéssel a kísérlet 8. hetére a teljes skDNS frakció közel 20%-át adja.
- A szabad DNS degradációjának elemzésekor megfigyeltem, hogy a C57BL/6 egerekbe injektált metilált DNS-szakaszok lebomlása lassabb a nem-metilált fragmentumokéhoz képest, így hosszabb ideig mutathatók ki a perifériás vérben. Továbbá, kísérleti eredményeim szerint a C38 tumorsejttel oltott állatokban a vérben található DNS molekulák stabilabbak, mint az egészséges egerekben.
- A humán mintákon végzett munkám során összeállítottam egy négy gént – *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2* és *PRIMA1* – tartalmazó biomarker panelt, amely az emelkedett metilációs szintnek köszönhetően magas szenzitivitással és specificitással képes elkülöníteni az adenóma és vastagbélrákos plazmamintákat az egészségesektől két-lépéses MethyLight PCR módszert alkalmazva.
- A metilációs mintázat változásáról tett megfigyeléseimet szöveti mintákon is megerősítettem a TCGA és a GEO adatbázisokból letöltött metilációs array adatok *in silico* elemzésével
- Immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazoltam, hogy a metilációs szint emelkedése adenóma és CRC mintákban befolyásolja a fehérjék kifejeződését és csökkent expressziót okoz mind a négy marker esetében.
- Eredményeim alapján a különböző szabad DNS izoláló módszerek és a vérvételi gyűjtőcsövek típusa is jelentősen befolyásolják a kinyert DNS mennyiségét és metilációs mintázatát egyaránt.

- A létrehozott metilációs biomarker panel egyéb non-invazív szűrőtesztekkel összevetve is hatékony módszernek bizonyult már a rákmegelőző állapotok diagnosztizálására is.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám során első lépésként a sejten kívüli DNS (skDNS) mennyiségi és minőségi jellemzőit elemeztem állatmodellek segítségével. Megállapítottam, hogy az SHO egerekre oltott humán HT-29-eredetű tumorból DNS molekulák szabadulnak ki, amelyek a teljes szabad DNS frakció megközelítőleg 20%-át teszik ki. Az irodalmi adatokkal összhangban tehát azt találtam, hogy a tumor növekedése folyamán megemelkedett skDNS szinthez az egészséges és rákos sejtek egyaránt hozzájárulnak. Az egészséges és C38 tumorrally oltott C57BL/6 egereken végzett szabad DNS stabilitására vonatkozó vizsgálataim azt mutatták, hogy az *in vitro* metilált humán DNS fragmentumok lassabb degradációval jellemezhetőek, hiszen PCR módszerrel az injektálást követő 24 órával később is kimutathatók a vérben, ellentétben a nem-metilált szakaszokkal. A tumorrally oltott állatokban a DNS szakaszok stabilabbnak mutatkoztak, mint az egészséges egerekben, ami feltételezéseink szerint részben a daganatos állatokban lecsökkent DNáz enzim aktivitásnak köszönhető. Az állatkísérletek eredményeire alapozva a szabad DNS frakció és a DNS metilációs mintázat elemzését célzó vizsgálataimat humán mintákon is folytattam. A humán plazmamintákon végzett kísérleteim szerint elmondható, hogy négy kiválasztott gén – *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, *PRIMA1* – metilációs státusza alapján az adenómás illetve CRC-s betegek magas szenzitivitással és specificitással elkülöníthetőek az egészségesektől. A metilációs állapot változásával kapcsolatos megfigyeléseimet humán szöveti mintákon is bizonyítottam. Az általam használt multiplex preamplifikációt tartalmazó kétlépeses MethyLight PCR módszernek köszönhetően az alacsony szabad DNS koncentrációjú plazmamintákban is azonosítani tudtam a fokozott metilációt mutató géneket, valamint a metiláció foka is mérhetővé vált. Számos minta-előkészítési protokollt teszteltem, és megfigyeléseim szerint az eltérő módszereken alapuló skDNS izolálási technikák a kinyert DNS mennyiségén kívül a metilációs státuszt is befolyásolják. Végül megállapítottam, hogy a 4 génből összeállított metilációs panel egyéb non-invazív vastagbélrák szűrő tesztekhez viszonyítva is nagy érzékenységgel mutatja ki már a rákmegelőző állapotokat is. Összefoglalva tehát, munkám során kialakítottam egy DNS metilációs változáson alapuló, vastagbél adenómát és rákot is jelző módszert, ami a betegség jelenlétét a perifériás vérből is képes nagy biztonsággal kimutatni. Kutatási eredményeim ezáltal lehetőséget adnak egy alternatív, minimálisan invazív diagnosztikai eljárás kidolgozásához, amely a betegek számára kevésbé megterhelő, ezzel növelve a vizsgálaton történő részvételi arányt.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

8.1. Magyar összefoglaló

A vastagbélrákot (CRC) folyamatosan emelkedő incidencia és mortalitás jellemzi, aminek részben a betegség késői stádiumban történő felismerése az oka. A vastagbélrák kialakulása során a genetikai változások mellett számos epigenetikai módosulás – beleértve a gének promóter régiójában történő DNS metilációt – halmozódik fel a tumorsejtekben, amelyek azonosítása a daganatok diagnosztizálására is szolgálhat. A tumoros sejtekből a DNS molekulák kikerülhetnek a véráramba, így a plazmában található sejten kívüli DNS (skDNS) frakció metilációs mintázatának vizsgálata egyszerű és ígéretes minimálisan invazív módszerre válhat a daganatok korai felismerésére. PhD munkám első lépéseként a szabad DNS felszabadulásának ütemét és stabilitását vizsgáltam állatmodellek használatával. Igazoltam, hogy az egerekre oltott humán HT-29-eredetű tumor növekedésével párhuzamosan a rákos szövetből folyamatosan DNS molekulák kerülnek a véráramba, amelyek a 8. hétre a teljes szabad DNS frakció közel 20%-át adták. Az skDNS stabilitására vonatkozó kísérletem során megfigyeltem, hogy a C57BL/6 egerekbe injektált metilált humán DNS szálak stabilabbak, mint a nem-metilált DNS molekulák, hiszen a kezelést követően 24 óra múlva is detektálhatóak voltak. Megállapítottam továbbá, hogy a C38 kolorektális adenokarcinóma sejtekkel oltott állatokban a DNS tovább mutatható ki a vérben az egészséges állatokhoz képest. A fenti eredményekre alapozva célul tűztem ki egy epigenetikai marker panel összeállítását, ami a daganat kialakulása során az egészségestől eltérő DNS metilációs mintázatot mutató géneket tartalmaz. Az *SFRP1*, az *SFRP2*, az *SDC2* és a *PRIMA1* génekről megállapítottam, hogy metilációjuk fokozódik már adenóma stádiumban is, és ez a szöveti minták mellett a plazmákban is kimutatható az általunk kialakított multiplex preamplifikációt tartalmazó két-lépéses MethyLight PCR módszerrel. Immunhisztokémai elemzésekkel bizonyítottam, hogy a megnövekedett metilációs szint a fehérjék expressziójának csökkenésével párosul mind a négy marker esetében. Számos skDNS izolálási módszert összevető kísérleti eredményem szerint a különböző minta-előkészítési technikák az skDNS mennyisége mellett a metilációs mintázatra is hatással vannak. Végül összehasonlítottam a metilációs panel érzékenységét egyéb non-invazív szűrőtesztekével, és vizsgálatom alapján elmondható, hogy a kialakított panel egyéb szűrési módszerekhez viszonyítva is nagy bizonyossággal jelzi már a rákot megelőző elváltozásokat is. Összefoglalásként elmondható, hogy kutatásom eredményei hozzájárulhatnak a vastagbélrákos és adenómás esetek mielőbbi felismeréséhez a betegeket kevésbé terhelő, folyadék biopszia-alapú mintavétel segítségével.

8.2. Angol összefoglaló

Colorectal cancer (CRC) is characterized by increasing incidence and mortality that is partly due to the diagnosis of mainly the late stages of the disease. During CRC development, in addition to genetic alterations, several epigenetic changes, including DNA methylation in the promoter regions accumulate in tumor cells that can be utilized for the early diagnosis of CRC. Cell-free DNA (cfDNA) in the circulatory system can originate also from tumor tissue; therefore the evaluation of tumor-related methylated DNA in the plasma fraction can be a simple and promising minimally invasive method for early cancer screening. In my PhD, as a first step, I have investigated the rate of cfDNA's release and defined the stability of methylated and non-methylated DNA fragments using animal models. I have confirmed that in SHO mice xenografted with human HT-29 cancer cells, DNA molecules were released into the blood-stream in parallel with the tumor growth. The amount of human DNA from tumors increased continuously and reached 20% of the whole cell-free DNA fraction for the 8th week. During my experiments analyzing the stability of cfDNA, I have observed that methylated DNA fragments injected into C57BL/6 mice were more stable as these fragments were detectable after 24h in contrast with non-methylated fragments. Moreover, the degradation of DNA fragments was slower in animals injected with C38 colorectal adenocarcinoma cells than in healthy mice. Based on these results I aimed to compile an epigenetic marker panel, which contains genes with altered DNA methylation pattern in the healthy - colorectal adenoma - cancer sequence. I have found that the methylation level of *SFRP1*, *SFRP2*, *SDC2*, and *PRIMA1* gene promoters has already increased in precancerous stages. The methylation level alterations have been detected in both tissue and plasma samples using two-step MethyLight PCR method with multiplex preamplification. Immunohistochemistry analyses have indicated decreasing protein levels of the four markers along the colorectal adenoma - carcinoma sequence in parallel with the elevated promoter methylation levels. I have tested diverse DNA isolation and blood collection methods, and according to our results, the level of cell-free DNA and the methylation pattern of specific genes have been influenced by these factors. Finally, I have compared the sensitivity of our methylation panel with other screening tests, and I have established that our panel also detects the precancerous lesions with high sensitivity compared with other tests. In conclusion, the results of my PhD work offer the possibility for early detection of colorectal adenoma and CRC cases using a potential minimally invasive, liquid biopsy-based method.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6): 1374-1403.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2): 69-90.
3. Altobelli E, Lattanzi A, Paduano R, Varassi G, di Orio F. (2014) Colorectal cancer prevention in Europe: burden of disease and status of screening programs. *Prev Med*, 62: 132-141.
4. Herszenyi L, Tulassay Z. (2010) Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14(4): 249-258.
5. Otto S, Kasler M. (2005) Trends in cancer mortality and morbidity in Hungarian and international statistics. Characteristics and potential outcome of public health screening programs. *Magy Onkol*, 49(2): 99-101, 103-107.
6. Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759-767.
7. Moran A, Ortega P, de Juan C, Fernandez-Marcelo T, Frias C, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. (2010) Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*, 2(3): 151-158.
8. Patai AV, Molnar B, Tulassay Z, Sipos F. (2013) Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 19(5): 607-615.
9. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimaraes DP. (2014) Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 20(10): 2634-2640.
10. Remo A, Pancione M, Zanella C, Vendraminelli R. (2012) Molecular pathology of colorectal carcinoma. A systematic review centred on the new role of the pathologist. *Pathologica*, 104(6): 432-441.
11. Haydon AM, Jass JR. (2002) Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol*, 3(2): 83-88.
12. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. (2012) Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 27(9): 1423-1431.

13. de la Chapelle A. (2003) Microsatellite instability. *N Engl J Med*, 349(3): 209-210.
14. Jass JR. (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1): 113-130.
15. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. (1993) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359(6392): 235-237.
16. Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP. (2000) APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci*, 97(7): 3352-3357.
17. Goss KH, Groden J. (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*, 18(9): 1967-1979.
18. Hao X, Frayling IM, Willcocks TC, Han W, Tomlinson IP, Pignatelli MN, Pretlow TP, Talbot IC. (2002) Beta-catenin expression and allelic loss at APC in sporadic colorectal carcinogenesis. *Virchows Arch*, 440(4): 362-366.
19. Polakis P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14(15): 1837-1851.
20. Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A. (1992) Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in FAP (familial polyposis coli) patients and in sporadic colorectal tumors. *Tohoku J Exp Med*, 168(2): 141-147.
21. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. (2016) Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469(2): 125-134.
22. Siddiqui AD, Piperdi B. (2010) KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol*, 17(4): 1168-1176.
23. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. (1994) The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev*, 8(10): 1174-1183.
24. Allen JI. (1995) Molecular biology of colon polyps and colon cancer. *Semin Surg Oncol*, 11(6): 399-405.
25. Cai Y, Ma W, Huang X, Cao L, Li H, Jiang Y, Lu N, Yin Y. (2015) Effect of survivin on tumor growth of colorectal cancer in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(10): 13267-13272.

26. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. (2014) Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(48): 18151-18164.
27. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. (2015) P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*, 21(1): 84-93.
28. Adimoolam S, Ford JM. (2003) P53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 2(9): 947-954.
29. Jass JR. (2004) HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*, 3(2): 93-100.
30. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. (2004) Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers*, 20(4-5): 199-206.
31. Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swensen J, Reddy S. (2016) High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Fam Cancer*, 15(3): 405-412.
32. Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. (2001) Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res*, 61(3): 827-830.
33. Sideris M, Papagrigoriadis S. (2014) Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer Res*, 34(5): 2061-2068.
34. Patai AV, Molnar B, Kalmar A, Scholler A, Toth K, Tulassay Z. (2012) Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis*, 30(3): 310-315.
35. Edwards JR, Yarychkivska O, Boulard M, Bestor TH. (2017) DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*, 10: 23.
36. Pal S, Tyler JK. (2016) Epigenetics and aging. *Sci Adv*, 2(7): e1600584.
37. Ling C, Groop L. (2009) Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, 58(12): 2718-2725.
38. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19(2): 187-191.

39. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3): 247-257.
40. Siedlecki P, Zielenkiewicz P. (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol*, 53(2): 245-256.
41. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. (1996) De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, 122(10): 3195-3205.
42. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929): 930-935.
43. Toyota M, Issa JP. (1999) CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*, 9(5): 349-357.
44. Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. (2013) DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 10(6): 327-335.
45. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*, 2011: 902674.
46. 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*, 96(15): 8681-8686.
47. Dukes CE. (1932) The classification of cancer of the rectum. *J pathol*, 35(3): 323-332.
48. Astler VB, Coller FA. (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 139(6): 846-852.
49. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. (2014) TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*, 7(9): 2828-2835.
50. Cairns SR, Scholefield JH, Steele RJ, Dunlop MG, Thomas HJ, Evans GD, Eaden JA, Rutter MD, Atkin WP, Saunders BP, Lucassen A, Jenkins P, Fairclough PD, Woodhouse CR; British Society of Gastroenterology; Association of Coloproctology for Great Britain and Ireland. (2010) Guidelines

- for colorectal cancer screening and surveillance in moderate and high risk groups (update from 2002). *Gut*, 59(5): 666-689.
51. Bond JH. (2000) Colorectal cancer update. Prevention, screening, treatment, and surveillance for high-risk groups. *Med Clin North Am*, 84(5): 1163-1182.
 52. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Coebergh JW, Damhuis RA, Faivre J, Martinez-Garcia C, Moller H, Ponz de Leon M, Launoy G, Raverdy N, Williams EM, Gatta G. (2005) Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut*, 54(2): 268-273.
 53. Basdanis G, Mekras A, Papadopoulos VN, Karamanlis E, Paramythiotis D, Mekras D, Panagiotou D, Panidis S, Michalopoulos A. (2011) A retrospective analysis of 2000 cases with colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol*, 15: S107-110.
 54. Burt RW. (2000) Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 119(3): 837-853.
 55. van Stolk RU, Beck GJ, Baron JA, Haile R, Summers R. (1998) Adenoma characteristics at first colonoscopy as predictors of adenoma recurrence and characteristics at follow-up. The Polyp Prevention Study Group. *Gastroenterology*, 115(1): 13-18.
 56. Midgley RS, Kerr DJ. (2000) ABC of colorectal cancer: adjuvant therapy. *BMJ*, 321(7270): 1208-1211.
 57. Ransohoff DF, Sandler RS. (2002) Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 346(1): 40-44.
 58. Watson AJ, Collins PD. (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*, 29(2): 222-228.
 59. Forde KA. (2006) Colonoscopic screening for colon cancer. *Surg Endosc*, 20: S471-474.
 60. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. (2002) Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med*, 346: 1781-1785.
 61. Sonnenberg A, Delco F. (2002) Cost-effectiveness of a single colonoscopy in screening for colorectal cancer. *Arch Intern Med*, 162(2): 163-168.
 62. Sharaf RN, Ladabaum U. (2013) Comparative effectiveness and cost-effectiveness of screening colonoscopy vs. sigmoidoscopy and alternative strategies. *Am J Gastroenterol*, 108: 120-132.

63. Irvine EJ, O'Connor J, Frost RA, Shorvon P, Somers S, Stevenson GW, Hunt RH. (1988) Prospective comparison of double contrast barium enema plus flexible sigmoidoscopy v colonoscopy in rectal bleeding: barium enema v colonoscopy in rectal bleeding. *Gut*, 29(9): 1188-1193.
64. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. (2008) Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, 134(5): 1570-1595.
65. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, Bond JH, Ansel H, Wayne JD, Hall D, Hamlin JA, Schapiro M, O'Brien MJ, Sternberg SS, Gottlieb LS. (2000) A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. National Polyp Study Work Group. *N Engl J Med*, 342(24): 1766-1772.
66. Kumar M, Cash BD. (2017) Screening and Surveillance of Colorectal Cancer Using CT Colonography. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 15(1): 168-183.
67. Pignone M, Campbell MK, Carr C, Phillips C. (2001) Meta-analysis of dietary restriction during fecal occult blood testing. *Eff Clin Pract*, 4(4): 150-156.
68. Tarpay A, Szabadosne Nemeth M, Orosz E, Kasler M, Burai M, Pap A, Otto S. (2011) A double immunochemical method for detecting faecal haemoglobin and albumin in rectal screening. *Magy Onkol*, 55(4): 268-273.
69. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, Tucker JP, Tekawa IS, Cuff T, Pauly MP, Shlager L, Palitz AM, Zhao WK, Schwartz JS, Ransohoff DF, Selby JV. (2007) Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 99(19): 1462-1470.
70. Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, Levin TR, Rex DK, Ahnen DJ, Knigge K, Lance MP, Burgart LJ, Hamilton SR, Allison JE, Lawson MJ, Devens ME, Harrington JJ, Hillman SL. (2008) Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*, 149(7): 441-450.

71. Ko CW, Dominitz JA, Nguyen TD. (2003) Fecal occult blood testing in a general medical clinic: comparison between guaiac-based and immunochemical-based tests. *Am J Med*, 115(2): 111-114.
72. 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(1): e85659.
73. Kadiyska T, Nossikoff A. (2015) Stool DNA methylation assays in colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol*, 21(35): 10057-10061.
74. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM. (2014) Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*, 370(14): 1287-1297.
75. Diaz LA, Jr., Bardelli A. (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 32(6): 579-586.
76. Mandel P, Metais P. (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*, 142(3-4): 241-243.
77. Seligmann M. (1957) Demonstration in the blood of patients with disseminated lupus erythematosus a substance determining a precipitation reaction with desoxyribonucleic acid. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 245(2): 243-245.
78. Ceppellini R, Polli E, Celada F. (1957) A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 96(3): 572-574.
79. Anker P, Stroun M, Maurice PA. (1975) Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*, 35(9): 2375-2382.
80. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37(3): 646-650.
81. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5): 318-322.
82. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 86(4): 774-779.

83. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. (1994) Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3(1): 67-71.
84. Chan KC, Lo YM. (2002) Circulating nucleic acids as a tumor marker. *Histol Histopathol*, 17(3): 937-943.
85. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. (2017) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 17: 223-238.
86. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 11(6): 426-437.
87. Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. (2005) Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*, 65(5): 956-961.
88. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. (2000) The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*, 906: 161-168.
89. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. (2007) Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 10(1): 52-56.
90. Mesa MA, Vasquez G. (2013) NETosis. *Autoimmune Dis*, 2013: 651497.
91. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(45): 16368-16373.
92. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F. (2010) Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*, 38(18): 6159-6175.
93. Peters DL, Pretorius PJ. (2011) Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA-a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*, 412(11-12): 806-811.
94. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. (2012) Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev*, 26(12): 1287-1299.

95. Valcz G, Galamb O, Krenacs T, Spisak S, Kalmar A, Patai AV, Wichmann B, Dede K, Tulassay Z, Molnar B. (2016) Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. *Mod Pathol*, 29(8): 928-938.
96. Spisak S, Solymosi N, Ittzes P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, Bartak BK, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z, Szállási Z, Rasmussen S, Sicheritz-Ponten T, Brunak S, Molnár B, Csabai I. (2013) Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*, 8(7): e69805.
97. Kowarsky M, Camunas-Soler J, Kertesz M, De Vlaminc I, Koh W, Pan W, Martin L, Neff NF, Okamoto J, Wong RJ, Kharbanda S, El-Sayed Y, Blumenfeld Y, Stevenson DK, Shaw GM, Wolfe ND, Quake S. (2017) Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(36): 9623-9628.
98. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP. (2006) Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*, 1075: 191-196.
99. van der Vaart M, Pretorius PJ. (2008) Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci*, 1137: 18-26.
100. Patutina O, Mironova N, Ryabchikova E, Popova N, Nikolin V, Kaledin V, Vlassov V, Zenkova M. (2011) Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie*, 93(4): 689-696.
101. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. (2001) Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci*, 945: 265-275.
102. Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M. (1994) Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation. *C R Acad Sci III*, 317(10): 869-874.
103. Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C. (2010) Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods*, 50(4): 302-307.
104. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. (2010) Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*, 411(21-22): 1611-1624.
105. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. (2002) Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*, 28(5): 255-271.

106. Toth K, Bartak BK, Tulassay Z, Molnar B. (2016) Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 16(2): 239-252.
107. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, Alexandersen K, Huang YS, Tzou WS, Lin SR. (2004) Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*, 28(7): 721-726.
108. Tanaka T, Tanaka M, Ishigamori R. (2010) Biomarkers for colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 11(9): 3209-3225.
109. Aghagolzadeh P, Radpour R. (2016) New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 22(25): 5678-5693.
110. Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2): 159-170.
111. Otori K, Konishi M, Sugiyama K, Hasebe T, Shimoda T, Kikuchi-Yanoshita R, Mukai K, Fukushima S, Miyaki M, Esumi H. (1998) Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*, 83(5): 896-900.
112. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y (1992) Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1(4): 229-233.
113. Bahnassy AA, Zekri AR, Salem SE, Abou-Bakr AA, Sakr MA, Abdel-Samiaa AG, Al-Bradei M. (2014) Differential expression of p53 family proteins in colorectal adenomas and carcinomas: Prognostic and predictive values. *Histol Histopathol*, 29(2): 207-216.
114. Suppiah A, Greenman J. (2013) Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 19(29): 4651-4670.
115. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89(7): 845-860.
116. Beroud C, Soussi T. (2003) The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat*, 21(3): 176-181.

117. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. (2008) High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*, 13(12): 1270-1275.
118. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, Granetto C, Fabozzi T, Miraglio E, Merlano MC. (2016) Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol*, 22(30): 6944-6954.
119. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz HJ, Garraway L, Waldman F, Warren R, Bild A, Collins-Brennan D, Hahn H, Harkin DP, Kennedy R, Ilyas M, Morreau H, Proutski V, Swanton C, Tomlinson I, Delorenzi M, Fiocca R, Van Cutsem E, Roth A. (2010) Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. *Oncologist*, 15(4): 390-404.
120. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, Qian ZR, Morikawa T, Shen J, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. (2013) Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*, 105(15): 1151-1156.
121. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, Goldberg RM, Limburg PJ, Thibodeau SN, Grothey A, Hubbard JM, Chan E, Nair S, Berenberg JL, McWilliams RR; Alliance for Clinical Trials in Oncology. (2014) Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*, 106(7).
122. Barras D. (2015) BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer*, 7(Suppl 1): 9-12.
123. Kidess E, Heirich K, Wiggin M, Vysotskaia V, Visser BC, Marziali A, Wiedenmann B, Norton JA, Lee M, Jeffrey SS, Poultsides GA. (2015) Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget*, 6(4): 2549-2561.
124. Kuo YB, Chen JS, Fan CW, Li YS, Chan EC. (2014) Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta*, 433: 284-289.

125. Lilleberg SL, Durocher J, Sanders C, Walters K, Culver K. (2004) High sensitivity scanning of colorectal tumors and matched plasma DNA for mutations in APC, TP53, K-RAS, and BRAF genes with a novel DHPLC fluorescence detection platform. *Ann N Y Acad Sci*, 1022: 250-256.
126. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY. (2005) APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg*, 71(4): 336-343.
127. Singh MP, Rai S, Suyal S, Singh SK, Singh NK, Agarwal A, Srivastava S. (2017) Genetic and epigenetic markers in colorectal cancer screening: recent advances. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(7): 665-685.
128. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. (2015) Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*, 149(5): 1204-1225.
129. Ashktorab H, Brim H. (2014) DNA Methylation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 10(4): 425-430.
130. Hashimoto Y, Zumwalt TJ, Goel A. (2016) DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Epigenomics*, 8(5): 685-703.
131. Yong WS, Hsu FM, Chen PY. (2016) Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin*, 9: 26.
132. Hatakeyama D, Tierling S, Kuzuhara T, Müller U. (2013) Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Nervous System. *Methods in Neuroethological Research*, 151-171.
133. Kurdyukov S, Bullock M. (2016) DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1).
134. Takamiya T, Hosobuchi S, Asai K, Nakamura E, Tomioka K, Kawase M, Kakutani T, Paterson AH, Murakami Y, Okuizumi H. (2006) Restriction landmark genome scanning method using isoschizomers (MspI/HpaII) for DNA methylation analysis. *Electrophoresis*, 27(14): 2846-2856.
135. Sanger F. (1975) The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 191(1104): 317-333.
136. Mihaly Z, Gyorffy B. (2011) Next generation sequencing technologies (NGST) - development and applications. *Orv Hetil*, 152(2): 55-62.

137. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*, 242(1): 84-89.
138. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375): 363-365.
139. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. (2008) Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc*, 3(12): 1903-1908.
140. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 28(8): E32.
141. Lao VV, Grady WM. (2011) Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(12): 686-700.
142. Yoshimura T, Nagahara M, Kuo C, Turner RR, Soon-Shiong P, Hoon DS. (2011) Lymphovascular invasion of colorectal cancer is correlated to SPARC expression in the tumor stromal microenvironment. *Epigenetics*, 6(8): 1001-1011.
143. Bouzourene H, Hutter P, Losi L, Martin P, Benhattar J. (2010) Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Fam Cancer*, 9(2): 167-172.
144. Crea F, Nobili S, Paolicchi E, Perrone G, Napoli C, Landini I, Danesi R, Mini E. (2011) Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: an opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies. *Drug Resist Updat*, 14(6): 280-296.
145. Lind GE, Danielsen SA, Ahlquist T, Merok MA, Andresen K, Skotheim RI, Hektoen M, Rognum TO, Meling GI, Hoff G, Bretthauer M, Thiis-Evensen E, Nesbakken A, Lothe RA. (2011) Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Mol Cancer*, 10: 85.
146. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, Kim NK, Issa JP. (2011) DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*, 117(9): 1847-1854.
147. Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV, DE Lima JM, Neto RA, Saad SS, Forones NM. (2013) DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 6(6): 1687-1692.

148. Kim YH, Lee HC, Kim SY, Yeom YI, Ryu KJ, Min BH, Kim DH, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, Kim HC, Chun HK, Grady WM, Kim YS. (2011) Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations. *Ann Surg Oncol*, 18(8): 2338-2347.
149. Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Bodor A, Tóth K, Patai Á, 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.
150. Vatandoost N, Ghanbari J, Mojaver M, Avan A, Ghayour-Mobarhan M, Nedaeinia R, Salehi R. (2016) Early detection of colorectal cancer: from conventional methods to novel biomarkers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142(2): 341-351.
151. Wang X, Kuang YY, Hu XT. (2014) Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(15): 4276-4287.
152. Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, Olson J, Sah J, Myeroff L, Platzner P, Lu S, Dawson D, Willis J, Pretlow TP, Lutterbaugh J, Kasturi L, Willson JK, Rao JS, Shuber A, Markowitz SD. (2005) Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst*, 97(15): 1124-1132.
153. Coppede F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. (2014) Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(4): 943-956.
154. Pack SC, Kim HR, Lim SW, Kim HY, Ko JY, Lee KS, Hwang D, Park SI, Kang H, Park SW, Hong GY, Hwang SM, Shin MG, Lee S. (2013) Usefulness of plasma epigenetic changes of five major genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 28(1): 139-147.
155. Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, Ito Y. (2007) Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep*, 18(5): 1225-1230.
156. Herbst A, Wallner M, Rahmig K, Stieber P, Crispin A, Lamerz R, Kolligs FT. (2009) Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with

- colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21(5): 565-569.
157. Ebert MP, Model F, Mooney S, Hale K, Lograsso J, Tonnes-Priddy L, Hoffmann J, Csepregi A, Rocken C, Molnar B, Schulz HU, Malfertheiner P, Lofton-Day C. (2006) Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 131(5): 1418-1430.
 158. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*, 54(2): 414-423.
 159. Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehke S, Stolz T, Model F, Roblick UJ, Bruch HP, Koch R, Liebenberg V, Devos T, Song X, Day RH, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. (2008) Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, 3(11): e3759.
 160. deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grutzmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. (2009) Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*, 55(7): 1337-1346.
 161. Tanzer M, Balluff B, Distler J, Hale K, Leodolter A, Rocken C, Molnar B, Schmid R, Lofton-Day C, Schuster T, Ebert MP. (2010) Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One*, 5(2): e9061.
 162. Hall PA, Russell SE. (2004) The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol*, 204(4): 489-505.
 163. Branchi V, Schaefer P, Semaan A, Kania A, Lingohr P, Kalff JC, Schafer N, Kristiansen G, Dietrich D, Matthaei H. (2016) Promoter hypermethylation of SHOX2 and SEPT9 is a potential biomarker for minimally invasive diagnosis in adenocarcinomas of the biliary tract. *Clin Epigenetics*, 8: 133.
 164. Song L, Li Y. (2017) Progress on the clinical application of the SEPT9 gene methylation assay in the past 5 years. *Biomark Med*, 11(6): 415-418.
 165. Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, Claus R, Arab K, Dyckhoff G, Plinkert P, Herpel E, Smiraglia D, Plass C. (2008) Frequently methylated tumor suppressor

- genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 68(12): 4494-4499.
166. Molnar B, Toth K, Bartak BK, Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*, 15(2): 171-184.
 167. Toth K, Sipos F, Kalmar A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnar B. (2012) Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One*, 7(9): e46000.
 168. Payne SR. (2010) From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics*, 2(4): 575-585.
 169. Calin GA, Croce CM. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6: 857-866.
 170. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56(11): 1733-1741.
 171. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18: 997-1006.
 172. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. (2009) Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One*, 4(7): e6229.
 173. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. (2009) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58(10): 1375-1381.
 174. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, Galandiuk S. (2012) Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg*, 256(3): 544-551.
 175. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, Ling S, Jiang L, Tian Y, Lin TY (2010) Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential

- diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(10): 1674-1680.
176. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, Harris CC, Chen K, Hamilton SR, Zhang W. (2011) Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One*, 6(3): e17745.
 177. Nagy Z, Szabo DR, Zsippai A, Falus A, Racz K, Igaz P. (2012) Relevance of long non-coding RNAs in tumour biology. *Orv Hetil*, 153(38): 1494-1501.
 178. Tusnady GE, Simon I, Varadi A, Aranyi T. (2005) BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res*, 33(1): e9.
 179. 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(4): 498-507.
 180. Niu F, Wen J, Fu X, Li C, Zhao R, Wu S, Yu H, Liu X, Zhao X, Liu S, Wang X, Wang J, Zou H. (2017) Stool DNA Test of Methylated Syndecan-2 for the Early Detection of Colorectal Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26(9): 1411-1419.
 181. Rice P, Longden I, Bleasby A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, 16(6): 276-277.
 182. Sengupta PK, Smith EM, Kim K, Murnane MJ, Smith BD. (2003) DNA hypermethylation near the transcription start site of collagen alpha2(I) gene occurs in both cancer cell lines and primary colorectal cancers. *Cancer Res*, 63(8): 1789-1797.
 183. Dahlman T, Lammerts E, Bergstrom D, Franzen A, Westermark K, Heldin NE, Rubin K. (2002) Collagen type I expression in experimental anaplastic thyroid carcinoma: regulation and relevance for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 98(2): 186-192.
 184. Cancer Genome Atlas Network. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407): 330-337.
 185. Galamb O, Kalmar A, Peterfia B, Csabai I, Bodor A, Ribli D, Krenacs T, Patai AV, Wichmann B, Bartak 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(8): 588-602.
186. 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(2): 418-429.
 187. Fackler MJ, Malone K, Zhang Z, Schilling E, Garrett-Mayer E, Swift-Scanlan T, Lange J, Nayar R, Davidson NE, Khan SA, Sukumar S. (2006) Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid. *Clin Cancer Res*, 12(11): 3306-3310.
 188. Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W, Schuster M, Kristiansen G. (2009) Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem*, 57(5): 477-489.
 189. Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F, Holtrup F. (2016) Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS One*, 11(11): e0166354.
 190. Wild N, Andres H, Rollinger W, Krause F, Dilba P, Tacke M, Karl J. (2010) A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 16(24): 6111-6121.
 191. Lee JH. (2013) Clinical Usefulness of Serum CYFRA 21-1 in Patients with Colorectal Cancer. *Nucl Med Mol Imaging*, 47(3): 181-187.
 192. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*, 18(1): 65-73.
 193. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*, 313(1-2): 139-142.
 194. Goebel G, Zitt M, Muller HM. (2005) Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias. *Dis Markers*, 21(3):105-120.

195. Lamphier MS, Sirois CM, Verma A, Golenbock DT, Latz E. (2006) TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N Y Acad Sci*, 1082: 31-43.
196. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*, 14(9): 985-990.
197. Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Gutierrez-Diaz B, De La Cruz-Siguenza D, Taja-Chayeb L, Gonzalez-Ballesteros M, Garcia-Lopez P, Chanona J, Duenas-Gonzalez A. (2016) Antitumor Effects of Systemic DNase I and Proteases in an In Vivo Model. *Integr Cancer Ther*, 15(4): NP35-NP43.
198. Mittra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, Gaikwad A, Prasannan P, Singh A, Iyer A, Singh A, Upadhyay P, Nair NK, Mishra PK, Dutt A. (2015) Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci*, 40(1): 91-111.
199. Razin A, Kantor B. (2005) DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol*, 38: 151-167.
200. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*, 10(8): 472-484.
201. Henriksen SD, Madsen PH, Larsen AC, Johansen MB, Drewes AM, Pedersen IS, Krarup H, Thorlacius-Ussing O. (2016) Cell-free DNA promoter hypermethylation in plasma as a diagnostic marker for pancreatic adenocarcinoma. *Clin Epigenetics*, 8: 117.
202. Zhang Y, Wang R, Song H, Huang G, Yi J, Zheng Y, Wang J, Chen L. (2010) Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, 303(1): 21-28.
203. Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, Cassingena A, Mussolin B, Falcomata C, Binder AM, Cristiano C, Oddo D, Guarrera S, Cancelliere C, Bustreo S, Bencardino K, Maden S, Vanzati A, Zavattari P, Matullo G, Truini M, Grady WM, Racca P, Michels KB, Siena S, Esteller M, Bardelli A, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F. (2017) Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut*, doi: 10.1136/gutjnl-2016-313372. [Epub ahead of print].

204. Baylin SB, Ohm JE. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6(2): 107-116.
205. Tamura M, Nemoto E. (2016) Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. *Jpn Dent Sci Rev*, 52(4): 75-83.
206. Silva AL, Dawson SN, Arends MJ, Guttula K, Hall N, Cameron EA, Huang TH, Brenton JD, Tavaré S, Bienz M, Ibrahim AE. (2014) Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer*, 14: 891.
207. Kim J, Kim S. (2014) In silico Identification of SFRP1 as a Hypermethylated Gene in Colorectal Cancers. *Genomics Inform*, 12(4): 171-180.
208. Rawson JB, Manno M, Mrkonjic M, Daftary D, Dicks E, Buchanan DD, Younghusband HB, Parfrey PS, Young JP, Pollett A, Green RC, Gallinger S, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B. (2011) Promoter methylation of Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 is associated with opposing tumor subtypes in two large populations of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*, 32(5): 741-747.
209. Galamb O, Kalmar A, Bartak BK, Patai AV, Leiszter K, Peterfia 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. *World J Gastroenterol*, 22(47): 10325-10340.
210. Lyu Z, Chen H, Jiang L, Zheng H, Hu J. (2014) Detection of RASSF2 and sFRP1 promoter region methylation in sporadic colorectal cancer patients. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 17(1): 41-44.
211. Bedin C, Enzo MV, Del Bianco P, Pucciarelli S, Nitti D, Agostini M. (2017) Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 140(8): 1888-1898.
212. Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Hektoen M, Wadsworth CA, Clausen OP, Karlsen TH, Foss A, Mathisen O, Schrumpf E, Lothe RA, Lind GE. (2012) Novel target genes and a valid biomarker panel identified for cholangiocarcinoma. *Epigenetics*, 7(11): 1249-1257.
213. Chim CS, Pang R, Fung TK, Choi CL, Liang R. (2007) Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Leukemia*, 21(12): 2527-2536.
214. Patai AV, Valcz G, Hollosi P, Kalmar A, Peterfia B, Patai A, Wichmann B, Spisak S, Bartak 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(8): e0133836.
215. Lu H, Huang S, Zhang X, Wang D, Yuan X, Zhang Q, Huang Z. (2014) DNA methylation analysis of SFRP2, GATA4/5, NDRG4 and VIM for the detection of colorectal cancer in fecal DNA. *Oncol Lett*, 8(4): 1751-1756.
216. Zhang H, Zhu YQ, Wu YQ, Zhang P, Qi J. (2014) Detection of promoter hypermethylation of Wnt antagonist genes in fecal samples for diagnosis of early colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(20): 6329-6335.
217. Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. (2007) Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol*, 13(6): 950-954.
218. Naini MA, Mokarram P, Kavousipour S, Zare N, Atapour A, Zarin MH, Mehrabani G, Borji M. (2016) Sensitive and Noninvasive Detection of Aberrant SFRP2 and MGMT-B Methylation in Iranian Patients with Colon Polyps. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(4): 2185-2193.
219. Zhang X, Song YF, Lu HN, Wang DP, Zhang XS, Huang SL, Sun BL, Huang ZG. (2015) Combined detection of plasma GATA5 and SFRP2 methylation is a valid noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenomas. *World J Gastroenterol*, 21(9): 2629-2637.
220. Rapraeger AC. (2000) Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol*, 149(5): 995-998.
221. Ryu HY, Lee J, Yang S, Park H, Choi S, Jung KC, Lee ST, Seong JK, Han IO, Oh ES. (2009) Syndecan-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells. *J Biol Chem*, 284(51): 35692-35701.
222. Popović A, Demirović A, Spajić B, Štimac G, Krušlin B, Tomas D. (2010) Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 13(1): 78-82.
223. Orosco A, Fromigue O, Bazille C, Entz-Werle N, Levillain P, Marie PJ, Modrowski D. (2007) Syndecan-2 affects the basal and chemotherapy-induced apoptosis in osteosarcoma. *Cancer Res*, 67(8): 3708-3715.
224. Chong Y, Mia-Jan K, Ryu H, Abdul-Ghafar J, Munkhdelger J, Lkhagvadorj S, Jung SY, Lee M, Ji SY, Choi E, Cho MY. (2014) DNA methylation status of a

- distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis. *Oncol Rep*, 31(6): 2535-2544.
225. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Johansen MB, Stender MT, Pedersen IS, Madsen PH, Thorlacius-Ussing O. (2017) Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer detection. *PLoS One*, 12(7): e0180809.
226. Dobbertin A, Hrabovska A, Dembele K, Camp S, Taylor P, Krejci E, Bernard V. (2009) Targeting of acetylcholinesterase in neurons in vivo: a dual processing function for the proline-rich membrane anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit. *J Neurosci*, 29(14): 4519-4530.
227. Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. (2002) PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*, 33(2): 275-285.
228. Sabunciyan S, Aryee MJ, Irizarry RA, Rongione M, Webster MJ, Kaufman WE, Murakami P, Lessard A, Yolken RH, Feinberg AP, Potash JB; GenRED Consortium. (2012) Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder. *PLoS One*, 7(4): e34451.
229. Teschler S, Gotthardt J, Dammann G, Dammann RH. (2016) Aberrant DNA Methylation of rDNA and PRIMA1 in Borderline Personality Disorder. *Int J Mol Sci*, 17(1): 67.
230. Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, Cheville JC, Neumann RM, Lieber MM, Tindall DJ, Young CY. (2006) PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 12(4): 1128-1136.
231. Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, Wei Y, Yang H, Keating MJ, Garcia-Manero G. (2010) Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics*, 5(6): 499-508.
232. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM, Hayes DF, Merajver SD, Rae JM, Tewari M. (2016) Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem*, 49(18): 1354-1360.
233. Norton SE, Lechner JM, Williams T, Fernando MR. (2013) A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood

- sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*, 46(15): 1561-1565.
234. Denis MG, Knol AC, Theoleyre S, Vallee A, Dreno B. (2015) Efficient Detection of BRAF Mutation in Plasma of Patients after Long-term Storage of Blood in Cell-Free DNA Blood Collection Tubes. *Clin Chem*, 61(6): 886-888.
 235. Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, Cochran RL, VanDenBerg DA, Yakim E, Cravero K, Chu D, Zabransky DJ, Wong HY, Croessmann S, Parsons H, Hurley PJ, Lauring J, Park BH. (2015) Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem*, 48(15): 993-998.
 236. Schmidt B, Beyer J, Dietrich D, Bork I, Liebenberg V, Fleischhacker M. (2015) Quantification of cell-free mSHOX2 Plasma DNA for therapy monitoring in advanced stage non-small cell (NSCLC) and small-cell lung cancer (SCLC) patients. *PLoS One*, 10(2): e0118195.
 237. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, Leszinski GS, Siegele B, Stotzer OJ, Nagel D, Holdenrieder S. (2011) Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*, 412(23-24): 2085-2088.
 238. Huang DJ, Zimmermann BG, Holzgreve W, Hahn S. (2005) Use of an automated method improves the yield and quality of cell-free fetal DNA extracted from maternal plasma. *Clin Chem*, 51(12): 2419-2420.
 239. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr. (2006) ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*, 24(33): 5313-5327.
 240. Booth SN, King JP, Leonard JC, Dykes PW. (1973) Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. *Gut*, 14(10): 794-799.
 241. Wang J, Wang X, Yu F, Chen J, Zhao S, Zhang D, Yu Y, Liu X, Tang H, Peng Z. (2015) Combined detection of preoperative serum CEA, CA19-9 and CA242 improve prognostic prediction of surgically treated colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(11): 14853-14863.
 242. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*, 37(7): 529-540.
 243. Thomas DS, Fourkala EO, Apostolidou S, Gunu R, Ryan A, Jacobs I, Menon U, Alderton W, Gentry-Maharaj A, Timms JF. (2015) Evaluation of serum CEA,

- CYFRA21-1 and CA125 for the early detection of colorectal cancer using longitudinal preclinical samples. *Br J Cancer*, 113(2): 268-274.
244. Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. (2014) Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 135(12): 2984-2991.
245. Song L, Peng X, Li Y, Xiao W, Jia J, Dong C, Gong Y, Zhou G, Han X. (2017) The SEPT9 gene methylation assay is capable of detecting colorectal adenoma in opportunistic screening. *Epigenomics*, 9(5): 599-610.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Barták BK, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. (2018) Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. *Pathol Oncol Res*, [Nyomtatás alatt] doi: 10.1007/s12253-018-0382-z. **IF: 1,736**

Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. (2018) [In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation]. A sejten kívüli szabad DNS felszabadulásának és degradációjának in vivo elemzése. *Orv Hetil*, 159(6): 228–238. **IF: 0,349**

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(9):751-763. doi: 10.1080/15592294.2017.1356957. **IF: 4,394**

Tóth K, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2016) Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 16(2): 239-252. doi: 10.1586/14737159.2016.1132164.

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(8): 588-602. doi: 10.1080/15592294.2016.1190894. **IF: 4,394**

Molnár B, Tóth K, **Barták BK**, Tulassay Z. (2015) Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*, 15(2): 171-184. doi: 10.1586/14737159.2015.975212.

Barták BK, Nagy ZB, Molnár B, Spisák S, Tulassay Z. (2012) A sejten kívüli szabad DNS, mint lehetséges jelátviteli molekula molekuláris és funkcionális vizsgálatának áttekintése. *Magy Belorv Arch*, 65(3): 148-156.

10.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények

Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, **Barták BK**, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2018) [Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer]. A DNS-metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során. *Orv Hetil*, 159(1): 3-15. doi: 10.1556/650.2018.30927.

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, Galamb O, **Barták BK**, Spisák S, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Colorectal adenoma and carcinoma specific miRNA profiles in biopsy and their expression in plasma specimens. *Clin Epigenetics*, 9(1): 22. doi: 10.1186/s13148-016-0305-3. **IF: 4,987**

Nagy ZB, **Barták BK**, Kalmár A, Galamb O, Wichmann B, Dank M, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2017) Comparison of circulating miRNAs expression alterations in matched tissue and plasma samples during colorectal cancer progression. *Pathol Oncol Res*, [Nyomtatás alatt] doi: 10.1007/s12253-017-0308-1. **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(3): 699-706. doi: 10.1007/s12253-016-0174-2. **IF: 1,736**

Patai ÁV, **Barták BK**, 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(3): 589-594. doi: 10.1007/s12253-016-0154-6. **IF: 1,736**

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. *World J Gastroenterol*, 22(47): 10325-10340. doi: 10.3748/wjg.v22.i47.10325. **IF: 3,365**

Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2016) miRNA Isolation from FFPET Specimen: A technical comparison of miRNA and total RNA isolation methods. *Pathol Oncol Res*, 22(3): 505-513. doi: 10.1007/s12253-015-0027-4. **IF: 1,736**

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(8): e0133836. doi: 10.1371/journal.pone.0133836. **IF: 3,057**

Kalmár A, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Tóth K, Leiszter K, Nielsen BS, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Gene-expression analysis of a colorectal cancer-specific discriminatory transcript set on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. *Diagn Pathol*, 10(1): 126. doi: 10.1186/s13000-015-0363-4. **IF: 1,895**

Füri I, Kalmár A, Wichmann B, Spisák S, Schöller A, **Barták BK**, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Cell free DNA of tumor origin induces a 'metastatic' expression profile in HT-29 cancer cell line. *PLoS One*, 10(7): e0131699. doi: 10.1371/journal.pone.0131699. **IF: 3,057**

Kalmár A, Péterfia B, Wichmann B, Patai ÁV, **Barták BK**, Nagy ZB, Furi I, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Comparison of automated and manual DNA isolation methods for DNA methylation analysis of biopsy, fresh frozen, and formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *J Lab Autom*, 20(6): 642-651. doi: 10.1177/2211068214565903. **IF: 1,297**

Spisák S, Solymosi N, Ittész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, **Barták BK**, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z, Szállási Z, Rasmussen S, Sicheritz-Ponten T, Brunak S, Molnár B, Csabai I. (2013) Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*, 8(7): e69805. doi: 10.1371/journal.pone.0069805. **IF: 3,534**

Nagy ZB, **Barták BK**, Molnár B, Spisák S, Tulassay Z. (2012) A keringő és szöveti mikro-rns-ek szerepe és kimutatásuk lehetőségei daganatos megbetegedésekben. *Magy Belorv Arch*, 65(3): 157-164.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik PhD munkám elkészítésében segítségemre voltak:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, valamint a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi Igazgatójának †Prof. Dr. Rácz Károly egyetemi tanárnak és Prof. Dr. Igaz Péter egyetemi tanárnak, hogy támogatták munkám elkészítését;
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Béla tudományos tanácsadónak, hogy irányítása alatt dolgozhattam a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratóriumában;
- Dr. Müllner Katalin és Dr. Nagy Géza házi opponenseimnek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért;
- mentoromnak, Dr. Spisák Sándornak, aki elindított a kutatói pályán és átadta a megfelelő kutató szemléletmódot;
- Dr. Kalmár Alexandrának szakmai tanácsaiért, a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért és barátságáért;
- Dr. Galamb Orsolyának, aki szakmai tapasztalatával mindig a segítségemre volt;
- Nagy Zsófia Brigittának a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségéért és barátságáért;
- Dr. Valcz Gábornak az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséért;
- Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzések kivitelezéséért;
- Kónyáné Farkas Gabriella, Tóth Bernadett és Kovács Hajnalka asszisztenseknek az immunhisztokémiai munkában és mintagyűjtésben nyújtott segítségükért;
- A Molekuláris Gasztroenterológiai Laboratórium munkatársainak: Dr. Tóth Kingának, Dr. Patai V. Árpádnak, Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Schöller Andreának, Dr. Leiszter Katalinnak, Dr. Fűri Istvánnak, Dr. Zsigrai Sárának és Szigeti Krisztinának támogatásukért;
- Berczik Máriának az adminisztratív feladatok megoldásában nyújtott elengedhetetlen segítségéért;
- a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópia személyzetének, akik nélkül a klinikai minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg;
- végül, de nem utolsó sorban Szüleimnek, Testvéreimnek, Férjemnek, minden Családtagomnak és Barátaimnak, akik PhD munkám alatt végig bíztattak és a nehéz helyzetekben is mellettem álltak.