

# Metilációs szabályozás alatt álló gének azonosítása lézerrel kimetszett vastagbél-daganat-sejtekben az adenoma–carcinoma sorrend vizsgálata során

SPIŠÁK SÁNDOR DR.<sup>1, 2\*</sup> ■ KALMÁR ALEXANDRA DR.<sup>2\*</sup>  
 GALAMB ORSOLYA DR.<sup>1, 2</sup> ■ SIPOS FERENC DR.<sup>2</sup>  
 WICHMANN BARNABÁS DR.<sup>2</sup> ■ MOLNÁR BÉLA DR.<sup>1, 2</sup>  
 TULASSAY ZSOLT DR.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,

II. Belgyógyászati Klinika, Sejtanalitika Laboratórium, Budapest

A DNS metilációs mintázatának megváltozása a tumorok kialakulása során bizonyítottan fontos folyamat. Ez azonban a tumorok különböző mikro környezetében különböző módon játszódik le, amelynek teljes genomszinten történő tanulmányozására még nincs hatékony, nagy áteresztőképességű módszerünk. *Célkitűzés:* Munkánk célja az, hogy azonosítsuk a vastagbél-daganatok kialakulásában és progressziójában szerepet játszó, DNS-metiláció által szabályozott géneket, génexpressziós vizsgálati módszerek felhasználásával. Ennek alapján olyan génexpresszió alapuló módszert mutatunk be, amely lézerrel kimetszett minták és metilációs sejt kultúra modell együttes felhasználásával lehetővé teszi a vastagbél-daganatokban zajló metilációs események genomszintű tanulmányozását. *Anyag és módszer:* HT-29 colorectalis adenocarcinoma-sejteket kezeltünk 10  $\mu$ M 5-aza-2'-deoxycitidin demetilációs ágenssel, majd meghatároztuk a kezelés hatására növekvő aktivitást mutató géneket. Ezzel párhuzamosan lézeres mikrokimetszéssel elkülönített ép, adenoma- és tumorszöveti mintákból 5000 hámsejtet gyűjtöttünk, majd azonosítottuk az adenoma–carcinoma szekvencia előrehaladtával szekvenciálisan csökkenő expressziót mutató géneket. A két géncsoport összehasonlításával meghatároztuk a feltehetően metilációs szabályozás alatt álló transzkriptumokat. Ezt követően független minták bevonásával RT-PCR megerősítést végeztünk. *Következtetések:* Az azonosított, adenoma–carcinoma szekvencia előrehaladtával csökkenő működésű gének szabályozása metilációs eseményekkel hozható összefüggésbe. Ennek alapján teljes genomszinten kimutathatók azok a géncsoportok – köztük például tumorsuppresszorok –, amelyek a betegség kialakulása és kórjóslata szempontjából kulcsfontosságúak. A módszerrel azonosított, vastagbél-daganatokra jellemző metilációs mintázatot mutató gének a jövőben kezelési célpontok lehetnek.

**Kulcsszavak:** epigenetika, metilációs szabályozás, génexpressziós mintázat

## Identification of methylation related genes from Laser Capture Microdissected colon samples during investigation of adenoma–carcinoma sequence

Changes of the DNA methylation pattern are proven to be an important process during tumorigenesis. This event can occur in several manners in the tumor microenvironment and there are still not any effective and high-throughput methods for genome-wide analysis of this phenomenon. *Aims:* Our aim was to identify colorectal cancer development and progression specific marker genes regulated by DNA methylation using gene expression analysis. In this study we present a gene expression-based method combined with a cell culture model, which can be used for a genome-wide analysis of the methylation events during the colorectal tumorigenesis. *Materials and methods:* Genes, which expression increased after the demethylation were determined in HT-29 colon adenocarcinoma cells treated with 10  $\mu$ M 5-aza-2'-deoxycytidine. In parallel, 5000 epithelial cells were collected with laser microdissection (LCM) from normal, adenoma and tumorous colonic samples. The genes with gradually decreasing expression along the

\*A szerzők a kézirat elkészüléséhez egyenlő mértékben járultak hozzá.

adenoma–carcinoma sequence were identified. By comparing the two groups, the transcripts, which are supposed to be regulated by methylation, could be determined. Finally, the identified gene set was validated on independent samples using RT-PCR. *Conclusion:* The regulation of the identified genes showing decreased expression during the adenoma–carcinoma sequence, can be associated with DNA methylation. On the basis of our results, the set of genes including tumorsuppressors can be determined genome-wide, which can be key factors in the formation and the prognosis of the disease. The identified genes showing colorectal cancer specific methylation pattern can be potential therapeutic targets in the future.

**Keywords:** epigenetics, methylation regulation, gene expression pattern

(Beérkezett: 2010. március 3.; elfogadva: 2010. március 25.)

## A vastagbél-daganatok metilációjának molekuláris háttere

A vastagbél-daganatok kialakulásának és progressziójának molekuláris hátterében a génműködések megváltozása áll, ami magában foglalja az onkogének aktiválódását, valamint a tumorsuppresszorok inaktiválódását [1, 2, 3]. Ez a jelenség különböző molekuláris okokra vezethető vissza. Ezek közé tartoznak részben a DNS-ben bekövetkezett változások (SNP, inszerció, delécio, duplikáció, metiláció) [4, 5, 6], részben az RNS-átírás és fehérjeszintézis szabályozásának módosulásai (splicing, miRNS, foszforiláció, glikoziláció, komplex képzés és különféle kölcsönhatások) [7, 8, 9, 10], valamint ezek együttes hatása [11], amelyek megjelennek fehérjeszinten is, vagyis hatással vannak a fenotípusra [12, 13, 14, 15, 16].

Ezek közül a DNS-metilációnak mint epigenetikai változásnak potenciális molekuláris mediátor szerep tulajdonítható, ezt a jelenséget azonban teljes genom-szinten a vastagbél-daganatok progressziója során még nem tanulmányozták.

A DNS-metiláció olyan, a DNS megkettőződését követő (posztreplikációs) módosulás, amely során leggyakrabban a citozin pirimidingyűrűjének 5. helyzetében lévő szénatomjához kovalens kötéssel egy metilcsoport kapcsolódik a genom C-G dinukleotidokban gazdag szakaszában, az úgynevezett CpG-szigetekben. A humán gének körülbelül felében találhatók ilyen 0,5–5 kilobázis hosszúságú szakaszok, amelyek gyakran a transzkripció faktorok által felismert 5' szabályozó régióban helyezkednek el. Ezek metilációs állapota az adott gén transzkripció aktivitását így közvetlenül meghatározza. A metilcsoport kapcsolódása részben a transzkripció faktorok kötődését fizikailag akadályozza, részben lehetővé teszi az úgynevezett metil-CpG-kötő doménnel rendelkező fehérjék (például MDB1-3, MeCP2) kapcsolódását, amelyek a gén átírására to-

vábbi fehérjék toborzásával szintén gátlóhatásúak [17, 18, 19].

A DNS-metiláció szintje tehát kapcsolatban áll a genetikai adatállomány állandóságával: egy adott gén CpG-szigetének hipometiláltsága esetén a gén transzkripcionálisan aktív, míg hipermetilált állapotban kifejeződése csökken vagy megszűnik. A hipometiláció pontos szerepe kevésbé ismert, a genetikai instabilitással hozható összefüggésbe. Ezzel ellentétben a hipermetiláció elsősorban az érintett (általában tumorsuppresszor) gének 5' szabályozó régiójában következik be, és a génkifejeződést elcsendesíti vagy megszünteti. Ezek a változások a daganatképződés korai szakaszában már megjelennek és az adott daganattípusra jellemző mintázatúak [20, 21].

A DNS-metiláció úgy befolyásolja a génműködést, hogy maga a DNS-szekvencia nem változik, a folyamat a demetilációs mechanizmus révén visszafordítható. Így a metilációt gátló szerekkel megvan az elvi lehetőségünk, hogy a korai szakaszban felismert daganat előrehaladását lassítsuk, illetve visszafordítsuk. Ehhez azonban a demetilációs folyamatot irányítanunk kell, amelyhez célzott eszközök, különleges szerek szükségesek. Ehhez az első lépés a célpontok azonosítása.

Számos metilációs szabályozású gént leírtak már, és erről több modell is ismert, azonban sok génről még nem tudjuk, hogy vajon metiláció szabályozza-e. Bár a kutatások előrehaladtával egyre több génről kiderül, hogy metiláció szabályozza, a folyamatot azonban részleteiben még nem ismerjük.

A vastagbél-daganatok jelenlegi molekuláris patológiai csoportosításának alapja a kromoszomális, illetve a mikroszatellita-instabilitás, valamint a CpG-sziget metilátor-fenotípus (CIMP) megléte vagy hiánya [22, 23]. A mikroszatellita-instabilitás bizonyos DNS-hiba-javító enzimek működésének (mismatch repair, MMR) károsodása (mutáció vagy metiláció) következtében kialakuló jelenség, melynek során genomátrendeződés

eredményeként gének, miRNS-ek aktiválódhatnak és inaktíválódhatnak.

Az adenoma–carcinoma szekvencia során kromoszómainstabilitás, aneuploidia figyelhető meg. Első lépésben az APC gén mutációjának és/vagy metilációjának következtében a normális hámsejtekből kóros crypták, majd kezdeti adenoma alakul ki. Ezt követi a K-Ras gén mutációja, amely adenoma kialakulásához vezet. A kezdeti adenomákból a DCC gén, valamint az MMR gének germline mutációjával kései adenoma alakul ki. A folyamat a p53 gén mutációjával folytatódik, amely végül carcinoma kialakulásához vezet. A mutációk számának növekedésével tumorsuppresszor gének inaktívvá válnak (IGF2R, BAX), amit a fokozott metiláció tovább segít.

A megváltozott metilációs mintázat is fontos szerepet játszik a vastagbélrák kialakulásában, és a genomális instabilitással is összefüggésbe hozható.

A karcinogenezis progresszív folyamatával párhuzamosan felhalmozódó genetikai mutációk mellett igazoltan szerepet játszanak a hibás DNS-metiláció következtében csökkenő kifejeződést mutató gének is. A daganatos sejtekre jellemző, hogy a teljes genom hipometilációja mellett párhuzamosan helyi hipermetiláció alakul ki bizonyos szövettani régiókban. A hipometiláció genomális instabilitáshoz vezet és igazoltan növeli a mutációs rátát is [24], míg a promóter régiókban bekövetkezett metiláció meghatározott gének, esetleg tumorsuppresszorok (p16, RB1, E-kadherin) működését inaktíválja [25, 26, 27, 28, 29, 30].

## A metiláció vizsgálatának lehetőségei

Az elmúlt években megjelent arrayrendszerek és a fejlődésnek indult teljesgenom-szekvenáló módszerek és platformok lehetővé teszik a DNS-metiláció teljes genom szinten történő vizsgálatát [31, 32, 33]. Ez azonban csak homogén szövetek vagy sejtvonalak esetében eredményes, mivel több sejttípusból felépülő szövetben egy adott gén metilációs mintázata sejttípusonként eltérő lehet. Így heterogén szövet vizsgálatakor – mint amilyen például a vastagbél-daganat – a mintagyűjtéshez ellenanyagon alapuló sejtelkülönítő módszerek vagy a lézeres mikrokimetszés nyújthat segítséget. Ezzel viszonylag kevés kiindulási mintamennyiséghez (néhány ezer sejt) juthatunk, ami a metilációs vizsgálatoknál nehézséget jelenthet, mivel a metilációs vizsgálatok során nincs lehetőség in vitro sokszorozótechnikák használatára, ugyanis a metiláció információ-tartalma a sokszorozóeljárások alkalmazásakor eltűnik. Ezzel ellentétben a metiláció eredménye, tehát maga a génexpresszió lézerral kimetszett és összegyűjtött mintákban is megbízhatóan vizsgálható, így lehetőségünk nyílik a metilációról közvetett módon, microarray-rendszerek alkalmazásával a teljes genom szintjén ismereteket nyerni.

A metiláció közvetett kimutatásának egyik legelterjedtebb formája a *biszulfít* átalakítás. A módszer lényege az, hogy a nem metilált citozin nukleotidok a biszulfitreakció során uracillá alakulnak, míg az 5. szénatomon metilcsoportot tartalmazó citozinek nem változnak. Így a metilálatlan citozin pozíciójában pontmutáció keletkezik, amely hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel tovább vizsgálható. A biszulfitszekvenálás megkülönbözteti a részlegesen metilálódott citozin-nukleotidokat, hátránya viszont az, hogy ismernünk kell a vizsgált génszakasz pontos szekvenciáját, és viszonylag korlátozott számú metilálódott szakasz vizsgálatát teszi lehetővé [34].

A *MeDIP* (methyl-DNA immunoprecipitation) alapú array- és nagy teljesítményű szekvenálórendszerek lehetővé teszik ugyan a teljes genom metilációs eseményeinek vizsgálatát, azonban kiinduláskor jelentős mennyiségű mintát igényelnek. A metilált DNS-darabok „kihalászása” 5'-metil-citozin-specifikus ellenanyagokkal történik, majd a visszanyert fragmentumok pozíció-, illetve szekvenciavizsgálatával folytatódik [35].

A *COBRA* (combined bisulfite restriction analysis) szintén kevés számú és ismert metilációs mintázattal DNS-szekvencia vizsgálatára alkalmas, és a vizsgált szakaszon belül metilációérzékeny restrikciós endonukleázfelismerő helyét is igényli [36].

Az általunk vizsgált lézerral kimetszett minták metilációs eseményeinek tanulmányozására a kis kiindulási mintamennyiségből adódóan nem érhető el optimális módszer. Emiatt vizsgálatainkban kettős megközelítést alkalmaztunk, amelyek során közvetett módon vizsgáltuk a metiláció génműködésre gyakorolt hatását. Elsőként olyan eljárást használtunk, amellyel azonosítottuk a vastagbél-daganatokban az adenoma–carcinoma sorrend előrehaladtával folyamatosan csökkenő működésű géneket. Ez után vizsgáltuk az azonosított gének kifejeződését olyan colonadenocarcinoma-sejtvonalon (HT-29), amelyet a metiláció kialakulását gátló reagenssel (5-aza-2'-deoxicitidin) kezeltünk. Ebben az esetben olyan gének fokozott működését észleltük, amelyek a demetiláció hatására felszabadultak az addig fennálló metilációs gátlás alól. A két vizsgálatból származó közös géneket (17) független minták bevonásával ellenőriztük valós idejű PCR-technikával.

## Anyagok és módszerek

### Szöveti minták

#### Mintagyűjtés

A sebészeti eltávolított szövetmintákat a kivételt követően 15 percen belül folyékony nitrogénbe helyeztük, majd  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A mintákról fénykép, valamint szövettani vélemény is készült, amelyek alapján a besorolást végeztük. A mintagyűjtés és fel-

használás a betegek beleegyezésével történt, a *TUKEB 2005/037* számú engedélye alapján.

Munkánk során 6 betegből származó ép, az adenoma és a vastagbél bal oldalán lokalizálódó (szigma, rectum), Dukes B stádiumú, közepesen differenciált adenocarcinomát vizsgáltunk. Az ép minta az eltávolított tumor melletti, lehetőleg minél távolabb rendelkezésre álló területről származott.

### Lézeres mikrokimetszés

#### (LCM – laser captured microdissection)

A szövetekből kriosztátban  $-20^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva  $6\text{ }\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítettünk, amelyek az LCM-hez használt, speciális membránbevonatú ( $1\text{ }\mu\text{m}$  PEN) tárgylemezre (Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország) kerültek. A metszeteket  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd felhasználáskor etanolos hígítási sorban való fixálás után Cresyl Violet acetát alkoholban oldódó festékekkel festettük. A minták teljes víztelenítése különösen fontos, ha később belőlük RNS-t izolálunk, mivel alkoholos festési protokollal igazoltan csökkenthető a lézeres mikrokimetszés folyamata során fellépő RN-áz enzimek aktivitásból fakadó RNS-lebomlása [37]. A lézeres kimetszéshez PALM Microbeam rendszert (PALM, Bernried) használtunk. Munkánk során átlagosan 5000 sejtet gyűjtöttünk mintaként, amelyből 5 biológiai replikátumot készítettünk.

### RNS-izolálás, minőség-ellenőrzés

A lézeres mikrokimetszéssel összegyűjtött sejtekből származó teljes RNS izolálását Qiagen RNeasy Micro kittel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük, a „Total RNA Isolation from Microdissected Cryosections” gyártói leírás szerint. Az RNS épségének vizsgálatát automatizált mikrokapilláris elektroforézis (Agilent BioAnalyzer 2100, Agilent, Palo Alto, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) rendszerrel végeztük a hozzá tartozó RNA 6000 Pico LabChips kittel (Agilent). A kísérlet során a 7-es vagy annál nagyobb RIN-értékű mintákat vontuk be. A további microarray-vizsgálatokhoz a teljes izolátumot, azaz 5–50 ng teljes RNS-t használtunk fel.

### Microarray

A transzkriptumok sokszorozásához és a jelöléshez kétkörös IVT- (in vitro transzkripció) (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) reakciót használtunk. A csipeket Fluidic Station 450 berendezéssel mostuk, és ellenanyag-sokszorozó festési eljárással festettük [EukGE\_Ws\_2v5 mosási protokoll és  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  sztreptavidin-fikoeritrin (Molecular Probes)]. A fluoreszcens jelek leolvasása Affymetrix Gene Scan 3000 készülék segítségével történt, amely során a csip felszínéről  $570\text{ nm}$ -en való gerjesztés után az észlelőrendszer (detektor)  $1\text{ }\mu\text{m}$ -es felbontású képet alkotott, amelyből a szoftver egy nyers fluoreszcenciaintenzitá-

sokat tartalmazó, úgynevezett cella- (CEL) fájlhozott létre.

### Sejtkultúramodell

#### Sejtenyésztés

Sejtenyészetenként 1,5 millió HT-29 colonadenocarcinoma-sejtet növesztettünk 10%-os FCS-tartalmú (Sigma-Aldrich, St. Louis, Amerikai Egyesült Államok) RPMI-1640 médiumban  $37^{\circ}\text{C}$ -on, 5%-os  $\text{CO}_2$ -koncentráció mellett.

#### 5-aza-2'-deoxicitidin-demetiláló kezelés

A demetilációs kezelést FCS-mentes médiumban  $10\text{ }\mu\text{M}$  5-aza-2'-deoxicitidin (Sigma-Aldrich) ágenssel végeztük 72 órán keresztül. Kontrollvizsgálatokban PCRTiszta vizet, valamint az 5-aza-2'-deoxicitidin oldószerét, ecetsavat alkalmaztunk.

### Microarray

A kezelt sejtekből teljes RNS-t az RNeasy Mini kittel (Qiagen) izoláltunk, amelynek épségét Agilent BioAnalyzer készülékkel ellenőriztük. A templát RNS mennyisége ( $2,5\pm 0,5\text{ }\mu\text{g}$ ) miatt a microarray-elemzés előtt elegendő egykörös IVT-sokszorozó és -jelölő reakciót végezni, amely után a hibridizáció, a mosás, a festés és a leolvasás a szöveti mintákon végzett módszerrel egyezően történtek.

### Valós idejű polimeráz láncreakcióval történő megerősítés (RT-PCR validáció)

#### HT-29 sejtenyészet

#### 5-aza-2'-deoxicitidin-demetiláló kezelés

Az előző vizsgálattal (teljes genom szintű génexpresszió) megegyező módon végeztük azzal a különbséggel, hogy a demetiláló ágens négy különböző ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ,  $5\text{ }\mu\text{M}$ ,  $10\text{ }\mu\text{M}$ ,  $20\text{ }\mu\text{M}$ ) koncentrációban alkalmaztuk.

### Szöveti minták

#### Mintagyűjtés, lézeres mikrokimetszés, RNS-izolálás, RNS-minőség-ellenőrzés

Az első vizsgálathoz hasonlóan történő mintagyűjtési eljárással 5 adenoma és 5 ép tumor mintapárt gyűjtöttünk. Az első kísérletben alkalmazott módszerekkel megegyezően a szövetekből metszetkészítést, lézeres mikrodisszekálást, majd RNS-izolálást végeztünk. A mintákat az RNS-minőség-ellenőrzés eredményei alapján vontuk be a kísérletbe.

#### Reverz transzkripció

A  $15\text{ }\mu\text{l}$  végtérfogató reakcióban MultiScribe Reverse Transcriptase enzimet ( $50\text{ U}/\mu\text{l}$ ), RNase Inhibitor ( $20\text{ U}/\mu\text{l}$ ),  $10\times$  RT puffert és  $100\text{ }\mu\text{M}$  dNTP-t (Applied



Biosystems, Foster City, Kalifornia) adtuk a mintákhoz. Az átíráshoz saját tervezésű génspecifikus primereket használtunk 200 nM-os végkoncentrációban. Az enzimek hozzáadása előtt a mintákat 5 percig 65 °C-on denaturáltuk, majd 4 °C-ra helyezve adtuk a reakciókhoz a reverz transzkriptázt és az RNáz-inhibítort, majd a mintákat 42 °C-on 30 percig inkubáltuk és 85 °C-on 5 percig inaktiváltuk.

### Elősokszorozás (preamplifikáció)

A lézerrel kimetszett minták korlátozott anyagmennyisége miatt a polimeráz láncreakció előtt szükséges volt elősokszorozó (preamplifikáció) lépést végeznünk az átírt cDNS-en. Ez azt jelenti, hogy a mérés előtt egy olyan PCR-reakciót végzünk, ahol a sokszorozást 10–12 cikluson keresztül folytatjuk, anélkül, hogy a komponensek telítésbe mennének. Egy 50 µl-es végtér fogatú reakcióban 5 µl templát cDNS-hez 25 µl Light Cycler Probes Mastert (2x PCR-reakciómix) (Roche, Basel, Svájc), 17 µl Light Cycler molekuláris biológiailag tiszta vizet és 3 µl génspecifikus, a reverz transzkripcióban használttal megegyező 200 nM végkoncentrációjú primer keveréket adunk. Negatív kontrollreakciókat is végeztünk, amelyekbe a templát helyett molekuláris biológiailag tiszta víz került. A hőciklus a következőképpen zajlott: 94 °C 5 perc, 12 ciklusban: 94 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, majd 2 perces 72 °C-os végső extenzió.

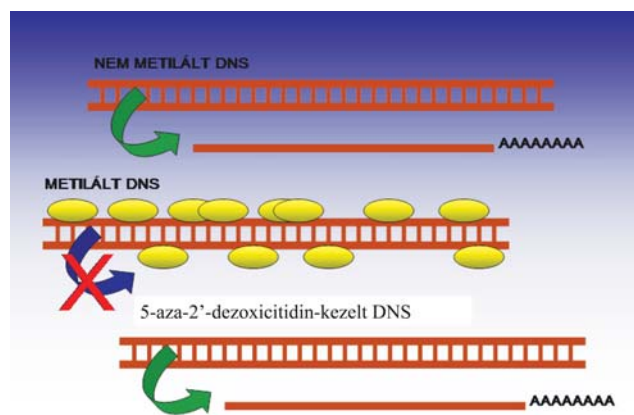
### Valós idejű PCR

Az elősokszorozott mintákat Light Cycler 480 típusú Real-time PCR-készüléken (Roche) 384 reakciós rendszerben SYBR Green assay-vel vizsgáltuk. A reakciókat 10 µl végtér fogatban végeztük, 2x Light Cycler Probes Master mix (Roche) felhasználásával a gyártói utasításoknak megfelelően. A 384 lyukú tálcák (multiwell plate) összemérése pipettázóautomata segítségével (Eppendorf epMotion 5070, Eppendorf, Hamburg, Németország) történt. Minden reakcióból génenként 3 párhuzamos mérés, valamint az elősokszorozott negatív kontrollreakciók mérése történt. A PCR-reakcióban a következő hőciklust használtuk: 95 °C 5 perc, 45 ciklusban ismételve 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 65 °C 1 perc után folyamatos felmelegítés 97 °C-ra, s végül 40 °C 30 s. A hőciklus végén végrehajtott olvadási görbe (melting curve) vizsgálattal ellenőriztük a képződött termékek specifikusságát.

## Eredmények

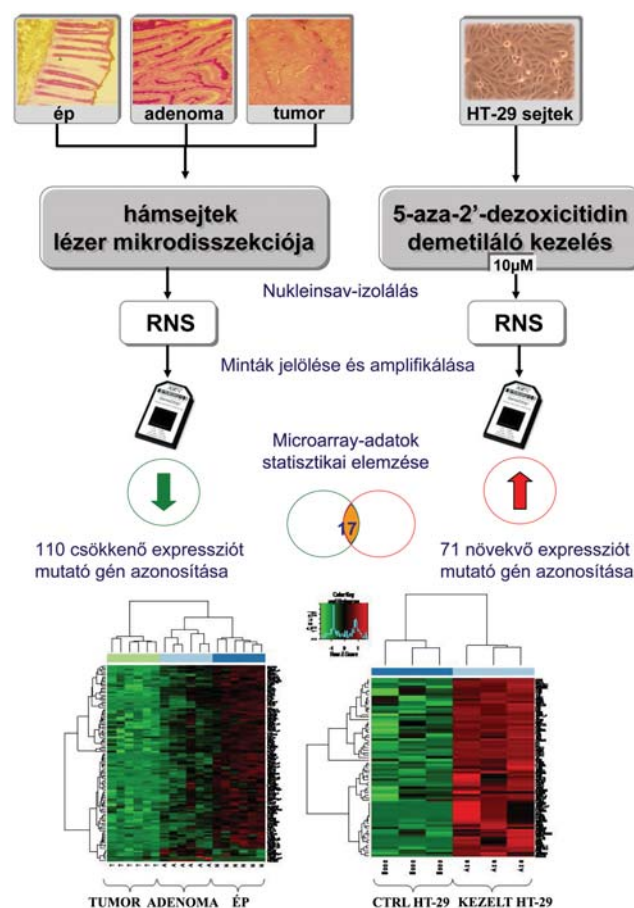
### Szöveti minták és a HT-29 sejtkultúra microarray-vizsgálata

Feltételezésünk szerint a tumorfejlődés során megváltozó metilációs mintázat nyomon követhető a génexpressziós változások vizsgálatával. Ha ugyanis egy gén promóter régiójában található CpG-sziget metilálódik,



1. ábra

A munka hipotézisének szemléltetőábrája, a metiláció és a génexpresszió közötti kapcsolat ismertetése. Ha egy gén 5' szabályozó régiójában található CpG-szigetek nem metiláltak, a gén átíródása zavartalan. Ha a régió metilált, a gén működése csökken. Demetiláció hatására a gén átíródása ismét megtörténik.



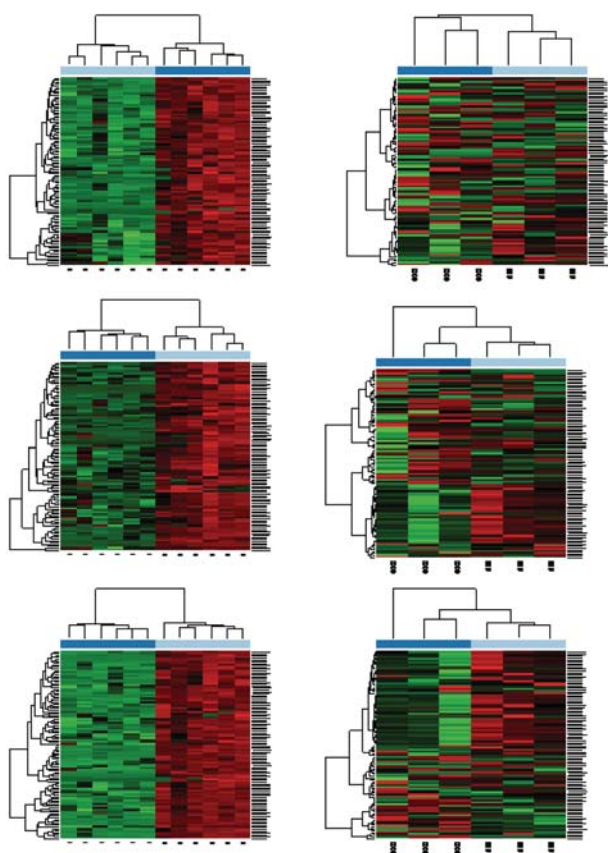
2. ábra

A munka stratégiája. Az adenoma–carcinoma előrehaladtával csökkenő expressziót mutató transzkriptumok, valamint a demetilációs kezelés hatására fokozott expressziót mutató gének kiválogatása és hőmérsékleti térképen történő ábrázolása

annak kifejeződése csökken vagy megszűnik. Ha azonban egy metilálódott szabályozó régió demetilálódik, akkor a gén újra működni kezd. Ezt a folyamatot az 1. ábra szemlélteti. Ennek igazolására úgynevezett

1. táblázat | A 17 kiválasztott gén jellemzőinek bemutatása

Csipazonosító	Génszimbólum	Génnev	Sejtfunkció
1556395_at	–	–	–
229147_at	–	–	–
234877_x_at	–	–	–
223484_at	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	–
236313_at	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	sejtciklus szabályozása
217451_at	COX5A	cytochrome c oxidase subunit Va	oxidáció – redukció
242608_x_at	FAM161B	Family with sequence similarity 161, member B	–
206422_at	GCG	glucagon	jelátvitel
204674_at	LRMP	lymphoid-restricted membrane protein	vezikuláris transzport
212092_at	PEG10	paternally expressed 10	apoptózis
226147_s_at	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor	transzkripció szabályozása
207109_at	POU2F3	POU class 2 homeobox 3	transzkripció szabályozása
215894_at	PTGDR	prostaglandin D2 receptor (DP)	jelátvitel
206631_at	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	jelátvitel
1554997_a_at	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	prostaglandin-bioszintézis, gyulladásválasz
235638_at	RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6	jelátvitel

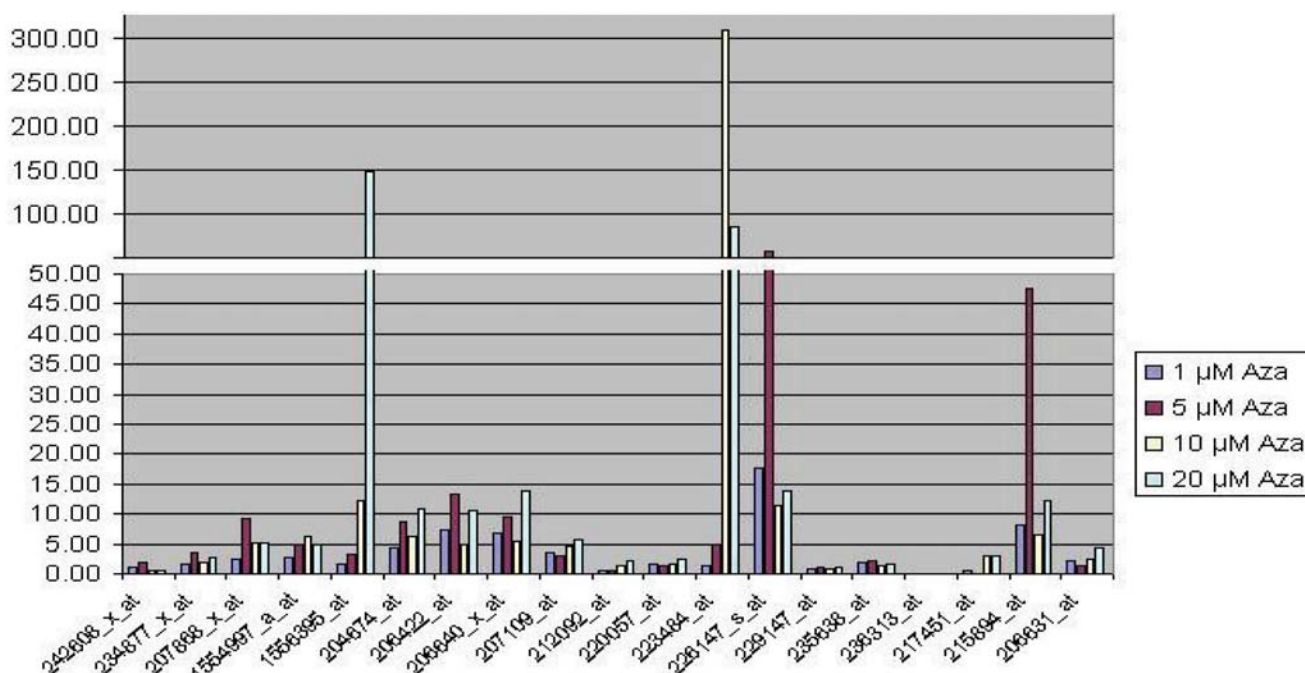


3. ábra

A három reláció (épi-adenoma, épi-tumor és adenoma-tumor) alapján kiválasztott TOP100 legnagyobb csökkenést mutató gén kiválasztása, majd sejtkultúramodellben történő visszakere-  
sése. Ezáltal igazoltuk a kiválasztott gének metilációhoz való viszonyát

PAM- (prediction analysis of microarray) megközelítéssel 110 olyan gént azonosítottunk, amelyek kifejeződése az egészséges bélhámsejtekben intenzív, adenoma hámsejtjeiben csökkenni kezd, majd a tumoros hámsejtekben még jobban mérséklődik vagy megszűnik. Ezeket a géneket és kifejeződési szintjeiket a 2. ábra szemlélteti. Ezt követően az 5-aza-2'-deoxicitidin-kezelt HT-29 sejtvonalak vizsgálatakor 71 olyan gént azonosítottunk, amelyek működése megnövekedett a demetilációs kezelés során, és legalább kétszeresen növekedtek  $p < 0,01$  valószínűség mellett. Ezek a gének az apoptózis (5), jelátviteli folyamatok (7), transzportfolyamatok (3), csontfejlődés (4), immunválasz (6), gyulladásválasz (9), transzkripció szabályozása (6), sejtprolifерáció (5), sejt–sejt közötti kommunikáció (6), motilitás (4) és egyéb vagy nem ismert (16) sejtfunkciókat érintik. A két lista 17 közös elemét RT-PCR technikával tovább vizsgáltuk, igazolva ezzel a csipadatok helytállóságát. A 17 vizsgált gén jellemzőinek bemutatását (annotáció) az 1. táblázat szemlélteti.

Annak igazolásaként, hogy a metiláció melyik lépcsőben a legaktívabb, a lézerral kimetszett minták három relációjának összehasonlítását visszakertük a sejtkultúramodell csiperedményein. SAM-analízis segítségével kiválogattuk az úgynevezett TOP 100 csökkent működésű gént épi-adenoma, épi-tumor és adenoma-tumor viszonyokban. Ezeket a géneket visszakertük a sejtkultúra csiperedményein. Majd kiválogattuk azokat, amelyeknek működése sejtkultúrában az 5-aza-2'-deoxicitidin demetilációs ágenssel történő kezelés hatására növekedett. Az elemzés eredményét a 3. ábra



4. ábra

A demetiláció génexpresszióra gyakorolt hatása HT-29 sejt kultúrán, különböző koncentrációjú (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) demetilációs ágenssel történő kezelésekre hatására

mutatja. Kiderült, hogy az ép-adenoma összehasonlításban tapasztalt csökkenő kifejeződés nem egyértelműen a metiláció hatására alakul ki, hiszen a 100 kiválogatott génből a modellben mindössze 12 működése növekedett az 5-aza-2'-deoxicitidin-kezelés hatására. Feltételezésünk a legnagyobb arányban, 55%-ban az ép és tumoros mintákból származó gének esetében igazolódott. Adenoma és tumor között 100 csökkent működésű transzkriptumból 32 esetében sikerült növekedést kimutatnunk a modellben, ezzel igazolva ezek metilációval történő szabályozását vastagbél-daganatokban.

### RT-PCR validációs vizsgálatok

#### 5-aza-2'-deoxicitidin-kezelt HT-29 sejt kultúra

A demetilációs kezelés hatásának vizsgálatához 4 különböző koncentrációban (1, 5, 10 és 20  $\mu$ M) kezeltünk HT-29 sejteket, majd ezeken vizsgáltuk a kiválasztott gének kifejeződését az ecetsavval kezelt kontrollhoz képest. A vizsgálat eredményeképpen kapott Ct-értékekből dCt-értékeket számoltunk a GAPDH háztartási gén alapján, majd az ecetsavas kontrollhoz viszonyítva meghatároztuk a ddCt-értékeket, amelyeknek kettes alapú logaritmusát, tehát az expresszió kifejező értékeit az 4. ábrán láthatók. A demetilációs ágenssel történő kezelés hatására, bár koncentráció-függés nélkül, de egyértelműen a vizsgált gének kifejeződése növekedett. Az azonosítókhoz tartozó géneket és jellemzésüket az 1. táblázat szemlélteti.

### Szöveti minták génexpressziós RT-PCR validálása

Az ép, az adenoma és a tumoros szövetekben a gén-csoportot RT-PCR módszerrel vizsgáltuk, a kapott Ct-értékekből dCt-értékeket GAPDH háztartási gén alapján határoztuk meg, majd összehasonlítást végeztünk az ép-adenoma, az ép-tumor, illetve az adenoma-tumor mintacsoportok között.

Az ábrákon az összehasonlításoknak megfelelően meghatározott ddCt-értékek láthatóak a kettő hatványára emelve, ahol minden diagram első oszlopa a 100%-ot jelzi.

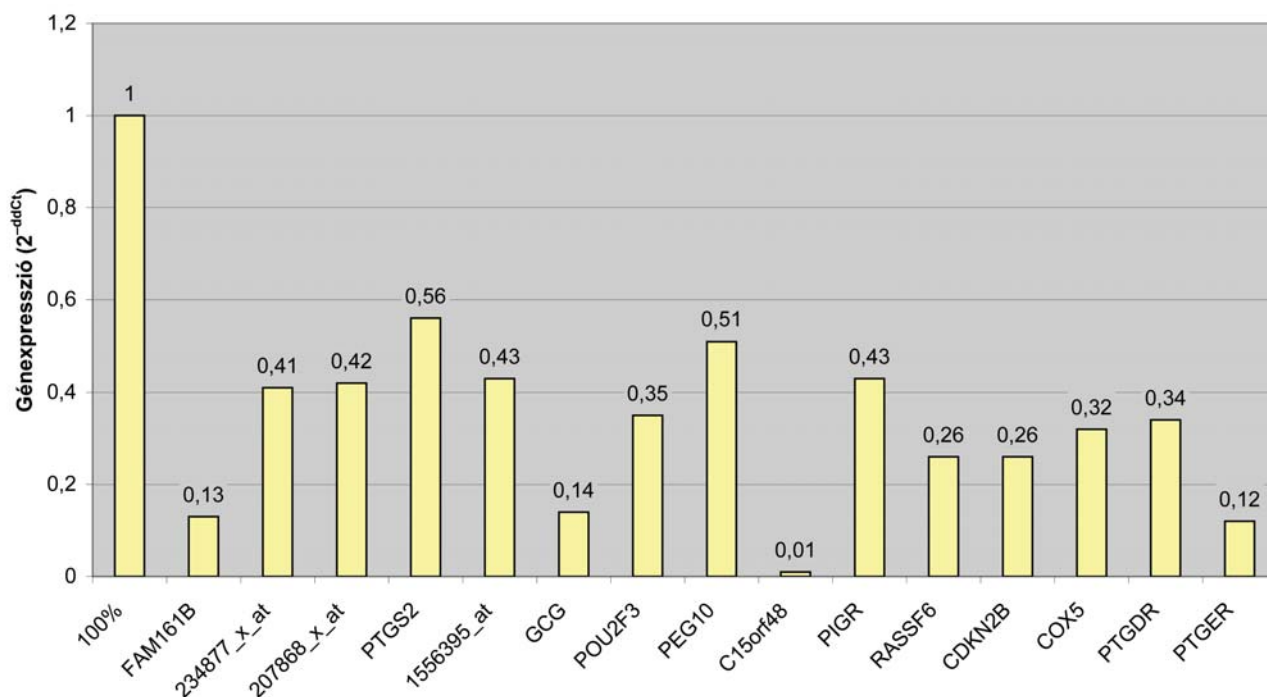
Az összehasonlításokban két állapot között egy adott gén kifejeződését abban az esetben tekintettük csökkenőnek, ha a kettő hatványára emelt ddCt értéke 0,6-nél alacsonyabb volt, illetve változatlan, ha 0,6–1,2 közé esett.

Az ép-adenoma összehasonlítás eredményei alapján 11 gén kifejeződése csökkent, ezek többsége legalább felére esett. Az ép-tumor összehasonlítási eredmények alapján 15 gén működése mérséklődött a két állapot között. Az adenoma-tumor összehasonlítás esetében 6 olyan gént azonosítottunk, amelyek kifejeződése tovább csökken a malignizálódás során (5. ábra).

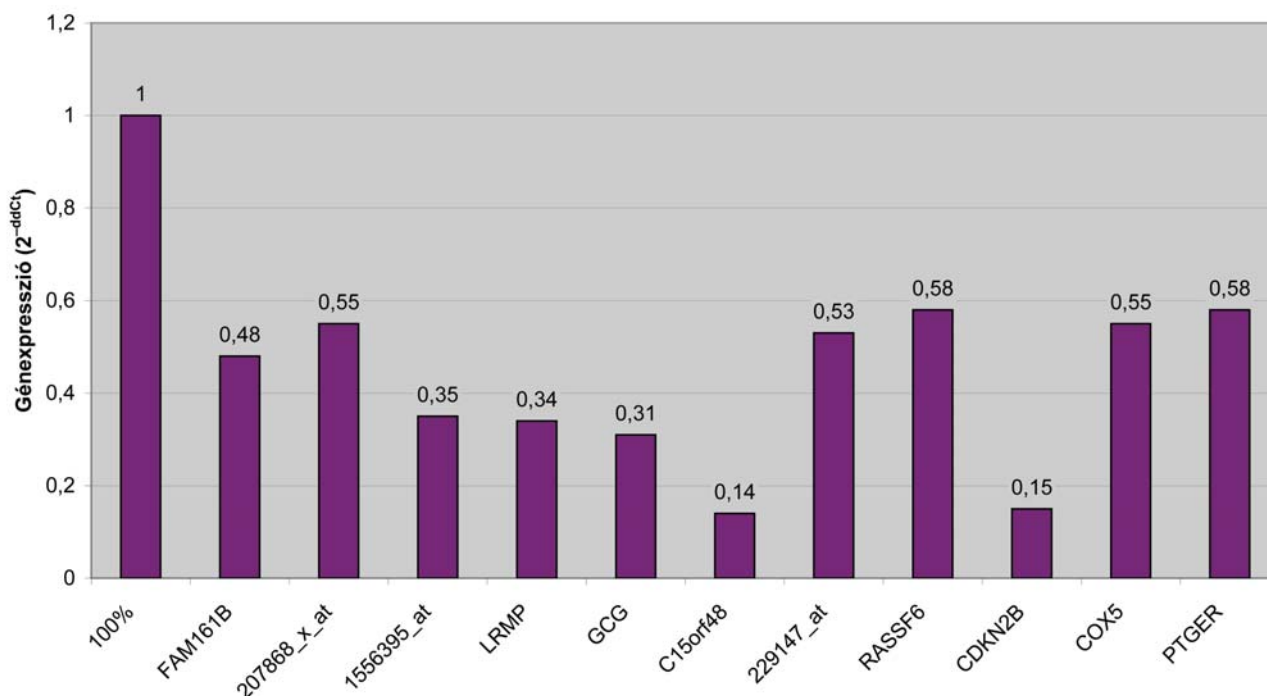
### Megbeszélés

Vizsgálataink során olyan géncsoportot tanulmányoztunk, amelynek tagjai vastagbél-daganatokban előzetes

## Ép vs. adenomahám összehasonlítása



## Ép vs. tumorhám összehasonlítása



5. ábra | A kiválasztott 17 gén validációja RT-PCR módszerrel, független minták bevonásával



microarray-adataink alapján csökkenő mértékben fejeződnek ki az adenoma–carcinoma szekvencia előrehaladtával, majd ugyanezek a gének a sejtkultúramodell-vizsgálatban demetilációs kezelés hatására aktiválódtak. Ezeknek a géneknek lézerral kimetszett mintákban és a HT-29 colonadenocarcinoma-sejtekben tapasztalt működésbeli változásai eredményeink szerint metilációs szabályozással függnek össze.

A kezelt HT-29 sejtkultúrában a DNS-metiltranszferázok gátlószereinek, az 5-aza-2'-deoxicitidin demetilálóagens koncentrációjának függvényében génenként eltérő mértékben, de egyértelműen a génkifejeződés növekedett, bár nem koncentrációfüggő módon (5. ábra). Ez azt jelenti, hogy a vizsgált géneket metiláció szabályozza. Optimális hatóanyag-koncentráció azonban nem állapítható meg a tökéletes demetilációhoz. Ennek oka lehet például a sejtek 5-aza-2'-deoxicitidin-demetilációs ágenssel szemben való érzékenysége vagy az egyes gének más-más módon történő reakciója (4. ábra). Ez alól csak a CDKN2B kivétel, ahol egy alternatív szabályozási folyamat (például a gént csendesítő metilációs gátlás alól felszabaduló miRNS) létezését feltételezzük. Mivel a demetilációs kezelés hatására ennek a génnek az aktivitása csökkent, a szabályozása nem hozható összefüggésbe közvetlenül a metilációval. A demetilációs kezelés hatására azonban olyan miRNS jelenhet meg, amelyik a CDKN2B transzkriptumát képes RNS-interferenciával elcsendesíteni. A CDKN2B esetében a csendesítés miatt adenomában és tumorban is az eredeti szint negyedére esett vissza a gén kifejeződése.

A szöveti minták eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált 17 gén közül az ép–adenoma összehasonlításban 11, míg az ép–tumor összehasonlításban 15 gén esetében tapasztaltunk csökkenést. Az adenoma–tumor állapot közt 4 gén esetében mutattunk ki jelentős mértékű csökkenést (5. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a metiláció már az adenoma kialakulása során csendesíti a vizsgált gének működését, és ez a folyamat a tumor előrehaladása során erősebbé válik.

Előzetes feltevéseink szerint a géncsoportban sikeresen validáltunk olyan tumorsuppresszort, mint a RASSF6, amely fontos szerepet játszik a normális sejtfelődés, illetve az apoptózis mediálásában [38, 39]. Eredményeink az irodalmi adatokkal megegyeznek, ugyanis ez a gén igazoltan epigenetikus szabályzású, daganatképződés során CpG-sziget-hipermetiláció miatt működése megszűnik. Tapasztalataink szerint az RASSF6 mind adenomában, mind tumoros állapotban csökkenő aktivitást mutat, szintén a promóter metilációnak köszönhetően.

A méhnyakrákban jellemzően aberráns DNS-metilációjú POU2F3 gén vizsgálatainkban szintén csökkent (75%, 35%) [40].

Az interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) által serkentett PIGR gén terméke a gyulladási folyamatokban játszik szerepet, fő feladata a polimer IgA-k transcytosissal való

kiürítése. Irodalmi adatok szerint HT-29 sejtekben aktivitása jelentősen megnő [41]. Metilációs szabályozottsága nem tisztázott.

Az általunk vizsgált microarray Affymetrix azonosítók közt adódott olyan, amelyhez annotált gén, így funkció sem rendelhető.

A nagy áteresztőképességű microarray-szűrővel és az azt kiegészítő, demetilációs kezeléssel sikeresen válogattunk ki olyan géneket, amelyek aberráns DNS-metiláció miatt a vastagbél-daganat előrehaladásával egyértelműen összefüggésbe hozhatóak. Az ilyen daganatspecifikus, C típusú (cancer related) metilációt mutató gének a jövőben a diagnosztika és terápia szempontjából egyaránt hasznos biomarkerek lehetnek.

A csipadatokkal és a validációs eredményekkel külön-külön is igazolható, hogy bizonyos gének metilálódása már az adenoma kialakulásakor megfigyelhető, viszont az adenoma–tumor átalakuláskor több gén szabályozása valósul meg a metiláció révén. A gyakorlatban ennek azért lehet fontos szerepe, mert a betegség korai felismerését követően lehetőség nyílik specifikus demetilációs kezelésekre vagy célzott génaktivációs módszerek alkalmazására.

## Irodalom

- [1] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. és mtsai: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 319, 525–532.
- [2] Jass, J. R.: Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit. Rev. Oncog.*, 2006, 12, 273–287.
- [3] Grady, W. M., Markowitz, S. D.: Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2002, 3, 101–128.
- [4] Carethers, J. M.: The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 1996, 25, 737–754.
- [5] Fearon, E. R.: Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surv.*, 1992, 12, 119–136.
- [6] Grady, W. M.: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2004, 23, 11–27.
- [7] Tang, J. T., Fang, J. Y.: MicroRNA regulatory network in human colorectal cancer. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2009, 9, 921–926.
- [8] Takayama, T., Shiozaki, H., Doki, Y. és mtsai: Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 1998, 77, 605–613.
- [9] Kim, Y. S.: Mucin glycoproteins in colonic neoplasia. *Keio J. Med.*, 1998, 47, 10–18.
- [10] Grady, W. M.: Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33, 684–688.
- [11] Dumont, N.: Genetic and epigenetic contributions to colorectal cancer. *Apmis*, 1999, 107, 711–722.
- [12] Sipos, F., Muzes, G., Valcz, G. és mtsai: Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2010, 45, 440–448.
- [13] Spisák, S., Galamb, B., Sipos, F. és mtsai: Applicability of antibody and mRNA expression microarrays for identifying diagnostic and progression markers of early and late stage colorectal cancer. *Dis. Markers*, 2010, 28, 1–14.
- [14] Spisák, S., Galamb, B., Wichmann, B. és mtsai: Vastagbél-daganatok ellenanyag-microarray-vel kimutatott TMA-validált progressziós markerei. *Orv. Hetil.*, 2009, 150, 1607–1613.

- [15] *Spisak, S., Guttman, A.*: Biomedical applications of protein microarrays. *Curr. Med. Chem.*, 2009, *16*, 2806–2815.
- [16] *Spisák S., Molnár B., Galamb O. és mtsai*: Fehérjechipek elméleti alapjai és alkalmazási lehetőségük az orvosi diagnosztikában és kutatásban. *Orv. Hetil.*, 2007, *148*, 1511–1520.
- [17] *Siedlecki, P., Zielenkiewicz, P.*: Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim. Pol.*, 2006, *53*, 245–256.
- [18] *Eden, S., Cedar, H.*: Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1994, *4*, 255–259.
- [19] *Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A. és mtsai*: Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, 1998, *19*, 187–191.
- [20] *Bai, A. H., Tong, J. H., To, K. F. és mtsai*: Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int. J. Cancer*, 2004, *112*, 846–853.
- [21] *Kurkjian, C., Kummar, S., Murgu, A. J.*: DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr. Probl. Cancer*, 2008, *32*, 187–235.
- [22] *Ogino, S., Goel, A.*: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.*, 2008, *10*, 13–27.
- [23] *Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M. és mtsai*: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 8681–8686.
- [24] *Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C. és mtsai*: DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 1998, *395*, 89–93.
- [25] *Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R. és mtsai*: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 1998, *72*, 141–196.
- [26] *Herman, J. G., Merlo, A., Mao, L. és mtsai*: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.*, 1995, *55*, 4525–4530.
- [27] *Garinis, G. A., Menounos, P. G., Spanakis, N. E. és mtsai*: Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J. Pathol.*, 2002, *198*, 442–429.
- [28] *Murao, K., Kubo, Y., Ohtani, N. és mtsai*: Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br. J. Dermatol.*, 2006, *155*, 999–1005.
- [29] *Mitomi, H., Fukui, N., Tanaka, N. és mtsai*: Aberrant p16(INK4a) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010, *136*, 323–331.
- [30] *Baylin, S. B., Herman, J. G.*: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.*, 2000, *16*, 168–174.
- [31] *Bibikova, M., Lin, Z., Zhou, L. és mtsai*: High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.*, 2006, *16*, 383–393.
- [32] *Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H. és mtsai*: Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, *462*, 315–322.
- [33] *Zhou, D., Qiao, W., Wan, Y. és mtsai*: Microarray-based methylation analysis using dual-color fluorescence hybridization. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2006, *66*, 33–43.
- [34] *Grunau, C., Clark, S. J., Rosenthal, A.*: Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.*, 2001, *29*, E65–5.
- [35] *Mohn, F., Weber, M., Schubeler, D. és mtsai*: Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods Mol. Biol.*, 2009, *507*, 55–64.
- [36] *Xiong, Z., Laird, P. W.*: COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 1997, *25*, 2532–2534.
- [37] *Galamb, O., Spisak, S., Sipos, F. és mtsai*: Reversal of gene expression changes in the colorectal normal-adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br. J. Cancer*, 2010, *102*, 765–773.
- [38] *Allen, N. P., Donniger, H., Vos, M. D. és mtsai*: RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene*, 2007, *26*, 6203–6211.
- [39] *Le Frere-Belda, M. A., Cappellen, D., Daher, A. és mtsai*: p15(INK4b) in bladder carcinomas: decreased expression in superficial tumours. *Br. J. Cancer*, 2001, *85*, 1515–1521.
- [40] *Zhang, Z., Huettner, P. C., Nguyen, L. és mtsai*: Aberrant promoter methylation and silencing of the POU2F3 gene in cervical cancer. *Oncogene*, 2006, *25*, 5436–5445.
- [41] *Piskurich, J. F., Youngman, K. R., Phillips, K. M. és mtsai*: Transcriptional regulation of the human polymeric immunoglobulin receptor gene by interferon-gamma. *Mol. Immunol.*, 1997, *34*, 75–91.

(Spisák Sándor dr.,  
Budapest, Szentkirályi u. 46., 1088  
e-mail: spisak@abc.hu)

### Budapesti rendelőbe keresünk

- foglalkozás-egészségügyi és háziorvosi szakvizsgával (területi ellátási kötelezettség nélkül) rendelkező szakorvost, napi 8 órás munkavégzésre és
- foglalkozás-egészségügyi és ideggyógyász szakvizsgával rendelkező szakorvost.

Az önéletrajzt kérjük elküldeni a [protoprevent@protoprevent.hu](mailto:protoprevent@protoprevent.hu) e-mail címre.