

# Vastagbélrák-hajlamosító DNS-szekvencia-variációk tumormentes és vastagbél-daganatos populációban Magyarországon

*Az egyedi daganathajlam becslése*

Szentirmay Zoltán dr.<sup>1,2</sup> ■ Kurcsics Judit dr.<sup>1</sup> ■ Csernák Erzsébet dr.<sup>2</sup>  
Tándor Ildikó Msc<sup>1</sup> ■ Tóth Erika dr.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istenhegyi Géndianosztika Kft., Budapest

<sup>2</sup>Országos Onkológiai Intézet, Budapest

Széles körű genetikai vizsgálatok (genome-wide association studies, GWAS) kimutatták, hogy a népességben olyan örökletes genetikai eltérések fordulnak elő, amelyek a sporadikus vastagbélrákok kialakulását befolyásolják. Ezek egy bázist érintő DNS-szekvencia-variációk (single nucleotide polymorphism, SNP), amelyek számos kromoszómában elszórta helyezkednek el, és ha éppen daganatkeletkezéssel kapcsolatos gének szomszédságában fordulnak elő, variábilis alléljaik megváltoztatják az adott, egyébként nem mutáns gének működését, és ezzel megnövelik a daganat kialakulásának kockázatát. Magyarországi adatokat kívántunk szolgáltatni hat vastagbélrák-hajlamosító SNP-kockázati szekvencia variációinak előfordulási gyakoriságáról és kockázatnövelő hatásáról vastagbélrákban, összehasonlítva a normál-kontrollpopulációval, továbbá vizsgáltuk a vastagbélrákban megbetegedett páciensek tumorlokalizációjának és RAS-mutációs státusának megoszlását is. Összesen 47 nem daganatos, illetve 47 daganatos beteg vérmintáját vagy a szájnyalvakahártyáról vett sejtmintáját vizsgáltuk. DNS-izolálás után a szekvenciavariációkat aszimmetrikus, úgynevezett LATE PCR és olvadáspontanalízis-módszerrel, két SNP-specifikus primer, jelöletlen próba és interkaláló fluoreszcens festék segítségével LC480 (Roche) típusú készüléken mutattuk ki. Vastagbélrákos betegekben előforduló daganathajlamosító SNP-k homozigóta kockázati alléljainak gyakorisági eloszlását hasonlítottuk össze nem daganatos személyek genomjában meglévő hasonló allélvariációk előfordulási gyakoriságával, továbbá az SNPnexus adatbázisban tárolt európai (CEU) populációs adatokkal. A vizsgált SNP-k homozigóta kockázati allélja a saját kontrolladatokhoz, illetve a CEU-populációhoz viszonyítva vastagbélrákban 1,5–2,3-szor gyakrabban fordult elő; a heterozigóta allélok egyforma gyakorisággal fordultak elő tumoros és kontrollpopulációban. Vizsgáltuk a hat SNP homozigóta kockázati alléljának együttes előfordulását egy időben, egy személyben. 47 vastagbélrákos betegünk között 3 esetben is volt olyan személy, akiben egyszerre három, 5 esetben egyszerre két különböző SNP homozigóta kockázati allélja fordult elő, 24 esetben valamelyik SNP-nek csak 1 kockázati allélját találtuk meg, 15 esetben nem találtunk kockázati allélt a DNS-mintákban. A 47 tagú nem daganatos kontrollpopulációban mindössze három személynél fordult elő egyszerre két különböző homozigóta kockázati allél, és 17 mintában csupán 1 kockázati allél fordult elő. A daganatos és a kontrollcsoportban a homozigóta kockázati allélok előfordulási gyakorisága egymástól szignifikánsan eltért. A vastagbélrák-lokalizáció a bal colonfélben, valamint a KRAS-mutáció szignifikánsan gyakoribb volt a homozigóta kockázati allélt hordozó betegekben. NRAS-mutáció a 47 daganatos mintában nem fordult elő. A genom alacsony penetranciával öröklődő szekvenciavariációi reálisan befolyásolják a vastagbélrák kialakulásának kockázatát a szomszédos gének működésére gyakorolt hatással, de a kockázat mértéke személyre szabott, és ezt a környezeti faktorok, illetve az étrend is befolyásolja.

Orv Hetil. 2018; 159(40): 1614–1623.

**Kulcsszavak:** vastagbélrákhajlam, egyedi rákkockázat, SNP, aszimmetrikus PCR

## Colorectal cancer susceptibility genetic variants in tumor free and colorectal carcinoma bearing Hungarian population

### *Individual predisposition to cancer*

Genome-wide association studies (GWAS) using population-based designs have identified many genetic loci, at which common variants can influence the risk of developing the sporadic colon cancers. These are single nucleotide polymorphisms (SNPs) located on different chromosomes, close to genes involved in cancer developing process, and the SNPs modify their functions, and as a consequence the cancer risk is increased. Our aim was to provide frequency distributions data of variable (risk) allele of six independent SNPs in patients with colorectal cancers and in control Hungarian population, predicting the increased risk effect of sequence variant of SNPs. We also investigated the frequency distribution of tumor localization between right or left half of large bowel as well as the RAS mutation status. 47 non-tumorous patients and 47 patients with colorectal cancer were given oral mucosa cells or blood samples for SNP analysis. After DNA isolation, an LC480 (Roche) type PCR instrument, asymmetric LATE PCR method and melting point analysis were used for detection of sequence variations, by the assistance of two SNP specific primers, unlabeled specific probe and intercalating fluorescent dye. Genomic frequency distribution of variable alleles of SNPs predisposed to tumor development have been investigated in colorectal cancer carrier patients and the results have been compared with the same allele frequency distribution data obtained from the non-tumorous control patients and from CEU population stored in SNPnexus data base. The homozygous risk alleles of SNPs showed a 1.5–2.3-time increase in colorectal cancer carrier patients then in control and CEU patients, but the heterozygous risk allele distribution was identical in tumorous and control population. The frequency distribution of homozygous risk alleles of six SNPs was also investigated in the same time and some patients. Among 47 patients with colorectal cancer, in 3 patients carrying 3 SNPs with homozygous risk alleles, in additional 5 tumor samples two and 24 samples contain only one SNP's homozygous risk alleles, and in 15 patients, SNPs with homozygous risk alleles do not occur. In 47 control patients, only 3 samples contain two SNPs with homozygous risk alleles and 17 samples contain only one SNP with homozygous risk alleles. Significant differences of the tumorous and the control population can be seen detected. NRAS mutation was not found. Our results showed a real increased risk effect of several newly recognized low-penetrance colorectal cancer susceptibility genetic variants by influence of the regulation of neighboring genes, however, the degree of cancer risk is individual, and influenced by others environmental factors, such as dietary factors.

**Keywords:** predisposition to colorectal cancer, individual cancer risk, SNP, asymmetric PCR

Szentirmay Z, Kurcsics J, Csernák E, Tándor I, Tóth E. [Colorectal cancer susceptibility genetic variants in tumor free and colorectal carcinoma bearing Hungarian population. Individual predisposition to cancer]. *Orv Hetil.* 2018; 159(40): 1614–1623.

(Beérkezett: 2018. március 19.; elfogadva: 2018. június 28.)

### Rövidítések

CEU = Central European Union; CI = konfidenciaintervallum; CIMP = (CpG island methylator phenotype) gén promóter hipermetiláció-fenotípus; COLCA2-gén = (colorectal cancer-associated gene 2) vastagbélrákkal összefüggő gén 2; CPG = (cytosine-phosphoguanine) citozin-guanin dinukleotid; CrC = (colorectal carcinoma) vastag- és végbélrák; EIF3H = (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H) a fehérjékre történő genetikai információ átírását megindító faktor 3 H al egysége; GWAS = (genome-wide association studies) számos szerző által összeadott egységes adatbázis alapján készült tanulmány; HEZ = heterozigóta; HOZ = homozigóta; Ka = kockázati allél; MSI-H = magas fokú mikroszatellitainstabilitás; PCR = polimeráz-lánreakció; SNP = (single nucleotide polymorphism) egy pontos nukleotidpolimorfizmus; SNPnexus = nemzetközi SNP-adatbázis; TCGA = (The Cancer Genome Atlas) Rákgenom Atlasz; TGFβ = (transforming growth factor beta) transzformáló növekedési faktor-béta

A vastagbélrák a második leggyakoribb daganatféleség Magyarországon, férfiaknál a tüdőrák, nőknél az emlőrák gyakoribb [1]. Kialakulását genetikai és környezeti faktorok egyaránt befolyásolják. A The Cancer Genome Atlas (TCGA) projekt célul tűzte ki a daganatok genetikai profiljának feltárását, és a colorectalis carcinomára (CrC-re) vonatkozó adataikat 2012-ben tették közzé [2]. Kimutatták, hogy a CrC-k kisebb része, mintegy 16%-a hipermutált, nagyobb része nem hipermutált. Az utóbbihoz tartoznak a mikroszatellitastabil, kromoszómáisan (genetikailag) instabil daganatok, amelyekre a WNT, RAS-MAPK, PI3K, TGFβ és a p53 szignálok érintettsége jellemző. A hipermutált csoportba a magas mikroszatellitainstabil tumorok tartoznak, mint az örökletes nem polyposis eredetű CrC (Lynch-szindróma), valamint az MLH1-gén promóter hipermetilációja következtében kialakult, „CpG island methylator phe-

notype” (CIMP) pozitív típusú időskori sporadikus CrC [3–5].

Az újabb vizsgálatok, az úgynevezett „genome-wide association studies” (GWAS) számos kromoszómában elszórtan olyan szekvenciavariációkat („single nucleotide polymorphism”, SNP) tártak fel, amelyek a sporadikus CrC kialakulásának megemelkedett kockázatát okozzák akkor, ha valamelyik sejtproliferációt szabályozó rákgén közelében helyezkednek el. Ilyenkor az egyes SNP-k úgynevezett kockázati (variábilis) alléljai olyan módon befolyásolják az egyébként ép rákgének működését, mintha azok funkciónyerő mutációval rendelkeznének [6–10].

Az utóbbi években kimutatták azt is, hogy táplálkozási faktorok, közöttük a hústartalmú diéták összefügghetnek a CrC kialakulásával, ami azon alapszik, hogy a húsok különböző anyagok – mint a heterociklikus aminok és policiklikus aromás szénhidrátok – forrásai lehetnek, amelyek magas hőmérsékleten történő sütés során rákkeltő vegyületekké alakulnak át. Ráadásul a feldolgozás során a húshoz adott nitrátok vagy nitritek a hemeredetű vasionnal endogén rákkeltő nitrozovegyületekké alakulnak [11, 12]. Legújabban néhány publikáció jelent meg a húsos étrend és a CrC-hajlamosító SNP-k egymásra hatásáról. Nem ismert az ilyen hatás mikéntje, azonban a daganathajlamosító SNP-k variábilis alléljai, a túlsütött vörös húsok fogyasztása és a CrC megemelkedett kockázata között szignifikáns összefüggés volt kimutatható; a fehér húsok fogyasztása és az egyéb diéták nem emelték a CrC kockázatát [13–18].

Ebben a tanulmányban nem vizsgáltuk az étrend és a daganathajlamosító SNP-k egymásra hatását, viszont magyarországi adatokat kívántunk szolgáltatni hat CrC-hajlamosító SNP daganatos kockázatnövelő hatásáról, ha az egyedül vagy többszörösen fordul elő egy időben egy személyben. Többszörös előfordulási gyakoriságot mások CrC-ben még nem vizsgáltak. Ezért a CrC-ben megbetegedett személyeknél az SNP-k örökletes kockázatal-lél-variációinak gyakorisági eloszlását összehasonlítottuk a nem daganatos személyekben meglévő allélvariációk előfordulási gyakoriságával, továbbá az ugyancsak nem daganatos SNP-nexus adatbázisban tárolt európai (CEU)

populációs adatokkal [19, 20]. A genotipizálást vastagbélrákban szenvedő betegek vérmintáiból és az egészséges felnőttek szájnyalakharlyajsejtjeiből végeztük DNS-izolálást követően. Végül összefüggést kerestünk CrC-ben megbetegedett páciensek daganathajlamosító SNP-kockázati alléljainak előfordulási gyakorisága és néhány klinikopatológiai paramétere között (daganatlokaliszáció, RAS-status).

## Betegek és módszerek

### Vizsgálati minták és kezeléseik

Összesen 47, az Országos Onkológiai Intézetben operált vastagbélrákos beteg vérmintáját, illetve 47 nem daganatos beteg szájnyalakharlyajáról erre a célra kifejlesztett eszközzel vett sejtmintát vizsgáltunk. A normál nem daganatos sejtmintákat az Istenhegyi Géndiagnosztika Kft.-be különböző célból látogató, biztosan nem daganatos betegek adták. Az Etikai Bizottság utasítása és a genetikai törvény előírása szerint minden egyes mintát adó személy részletes beleegyező nyilatkozatot írt alá arról, hogy a „Betegségekre hajlamosító DNS-szekvenciavariációk kimutatása, a daganatos betegségek megelőzése, korai diagnózisa és az egyénre szabott kezelés jobb megítélése céljából” (KMR\_12\_A) a kutatáshoz önkéntesen vizsgálati mintát ad. A „Beleegyező nyilatkozat” részletesen tartalmazta a DNS-minták tárolására és a genetikai adatok felhasználására vonatkozó megkötéseket és azt is, hogy a mintákért a donor anyagi juttatást nem kap. Az adatkezelési eljárások is részletesen rögzítésre kerültek. A feldolgozás során minden minta azonosítása kódszámmal történt, a vizsgálatban szereplők személye ilyen módon nem kereshető vissza.

### A vastagbélrák-hajlamosító SNP-k kiválasztása

A vizsgált daganathajlamosító mutációk kiválasztása előzetes részletes irodalmi keresés alapján történt. A kiválasztást GWAS-adatokra alapoztuk, amelyek szignifikáns

1. táblázat | A vizsgált CrC-hajlamosító SNP-k genetikai jellegzetességei

SNP	Kromoszóma	SNP-pozíció	SNP-hatás a szomszédos génekre	Gén*	Rizikóallél	Irodalom
rs4143094	10p14	8089136-8089136	GATA3-expresszió-gátlás	GATA3	T	17
rs6983267	8q24.21	128413155-128413454	Wnt-szignál-aktiválás	CCAT2, MYC	G	21–24
rs9929218	16q22.1	68820746-68821125	Az E-cadherin transzkripció faktor működésére hat	CDH1	A	25–27
rs16892766	8q23.3	117630683-117630683	A sejtosztódás szabályozása	EIF3H	C	25, 28–30
rs3802842	11q23.1	52586341-52586341	A génműködés szabályozására gyakorolt hatás	COLCA2	C	25, 29, 31
rs10795668	10p14	8701219-8701219	GATA3-expresszió-gátlás	GATA3	A	32, 33

\*Gén: az SNP-hez legközelebb eső gén, amelyre az SNP hat.

CrC = colorectalis carcinoma; SNP = egyponos nukleotidpolimorfizmus

2. táblázat | SNP-specifikus PCR-primerek és -próbák

SNP	Nukleotid-variáció	fw. Primer	rev. Primer	Jelöletlen próba
rs4143094	G/T	ATGGGAGTGGGAAG-CCCTGA	ATCCCTAATTCCTGCCAC	GGGTTTCTGTTGGGTTGCCAGTTG-CCCT-AmMO
rs6983267	G/T	GACGAA-TAAACTCTCCTACCA	AACTTGCTGGGTTCCCTG-CCCTT	TGTACTTTTCTCAGTGCCTTTCATCTG-CT-AmMO
rs9929218	G/A	CCAAAGGTCAGAGGCA-GAGGGT	TCTAGGGCCACATTTTCCA-AG	TTCCACAACGGCTTTCCTGTGTT-AmMO
rs16892766	A/C	AGTTGGCATTTCATGT-TACTCTG	CTAGGG-GAAAACCTTTTGGGTGA	GGCATAACCTTTAACAGCGAATAGTCTT-GAAACTG-AmMO
rs3802842	A/C	TGTGGGGCTCAG-GATTTG	GGAAGGGAGGATGTTCCA-CACAG	GAGGTGAATTTCTGGGAGAGATTTTC-TATGGGT-AmMO
rs10795668	A/G	TCACTCACCAG-CAATCTCTTTTCCA	GAGGAAAGTAGAGACAAT-CAGGT	GCAGCAGAAAAGAGAAAAAGTTAGATTCT-TAGA TT CCATGATTTTATATTTC-AmMO

fw = (forward) a DNS szintézis iránya 5'-3' az egyik templát szálon; PCR = polimeráz-lánreakció; rev = (reverse) a DNS szintézis iránya 3'-5' a másik templát szálon; SNP = egy pontos nukleotidpolimorfizmus

összefüggést mutattak ki egyes SNP-k kockázati (variábilis) alléljai és a vastagbélrák előfordulási gyakorisága között. A kiválasztott SNP-k genetikai adatait és hatásukat részletesen az 1. táblázat [17, 21–33] tartalmazza.

### Mintavétel és DNS-izolálás

A szájnyalakártya-mintavétel az „SK-2 Buccal Swabs” eszközzel a mellékelt használati útmutató szerint, ezt követően a DNS-izolálás előkészítése az „DSK DNA Stabilization and Lysis Kit”-tel, a csatolt protokoll szerint történt (mindkettő gyártója: Isohelix, Harrietsham, Egyesült Királyság). A DNS izolálását „Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit” felhasználásával, a Magna Pure Compact (Roche, Bazel, Svájc) DNS-izoláló automatával végeztük. A vérből történő DNS-izolálást a „QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)” (Kurabo Industries Ltd., Oszaka, Japán) segítségével, a mellékelt protokoll utasításai szerint végeztük. A használt fluoreszcens festék az LC Green Plus volt (a gyártó cég a BioFire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, UT, USA).

### PCR-vizsgálat

A szekenciavariációk kimutatása aszimmetrikus úgynevezett Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR-rel történt [34]. A reakcióhoz ugyanazt az SNP-specifikus primer és jelöletlen próbát használtuk mind a normál (wt), mind a mutáns (mut) genomiális DNS szekvencia esetén (2. táblázat). A primerek tervezésekor figyelembe vettük, hogy más SNP-kötőhelyeket ne érintsen, így biztosítva, hogy mindkét allélt pontosan detektáljuk. Az eltérő olvadáspontú primerek lehetővé tették, hogy a reakciókeverékben 1 : 10 arányban alkalmazzuk őket, ami a DNS-templát hatékonyabb megsokszorozódását eredményezi, és érzékenyebb detektálást tesz lehetővé. A

próba mindig a többletprimer által adott DNS-szára illeszkedett. A PCR-amplifikáció elvégzését követően a szekenciavariációk kimutatása a reakcióelegyhez adott interkaláló fluoreszcens festék alkalmazásával, olvadáspont-analízis segítségével, LC480 (Roche) típusú készülményen történt (1. ábra).

### Klinikopatológiai korreláció

A nem daganatos (normál) kontrollegyéneknél csak a nemet és az életkort rögzítettük, a daganatos betegek esetén viszont a nem és az életkor mellett a tumor lokalizációját és a KRAS-, NRAS-mutációs státust is figyelembe vettük.

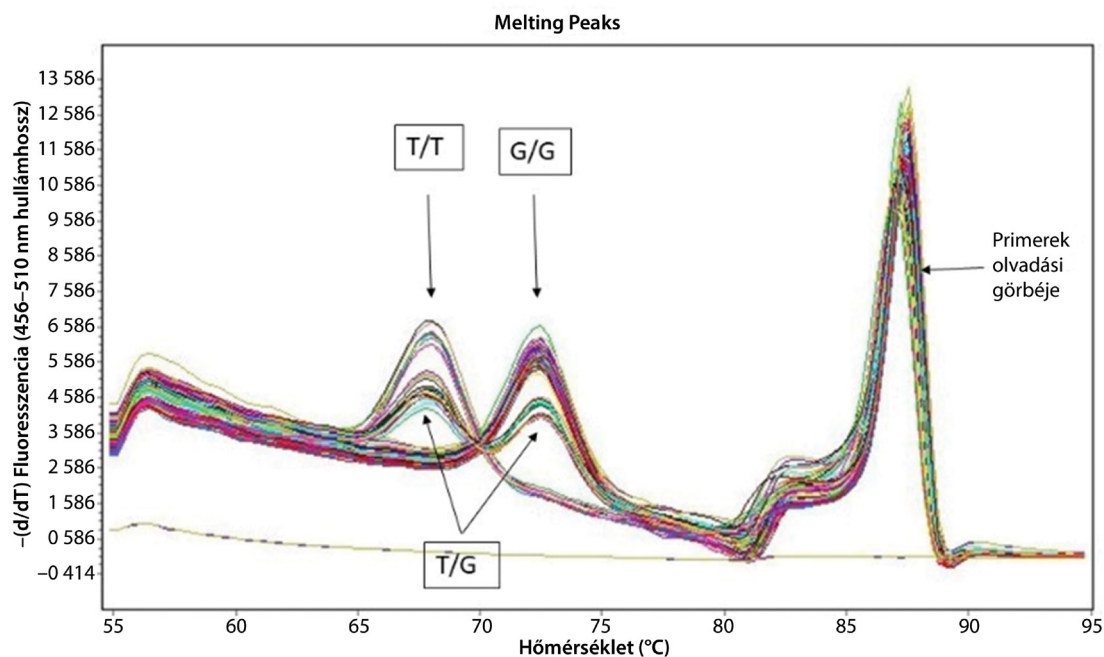
### Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai vizsgálatához a következő programokat használtuk: (a) Pearson-féle  $\chi^2$ -tesztet és BMDP Statistical Software (University of California) (b) MedCalc Software's VAT registration no. BE 0809 344 640, Acaciaaan 22, 8400 Ostend, Belgium.

A P- (probability) érték számítását a software Sheskin módszere szerint végeztük és a  $\leq 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikáns különbségnek két összehasonlított adat között.

### Eredmények

A vastagbélrákos betegekben talált örökletes daganathajlamosító SNP-k minden allélvariációjának előfordulási gyakoriságát összehasonlítottuk a párhuzamosan vizsgált nem daganatos betegek SNP-allél-variációinak, továbbá az SNPnexus adatbázisban lévő európai (CEU) HapMap-szekvencia variációinak előfordulási gyakoriságával [19, 20] (3. táblázat). A táblázatban az egyes genotípusok mintaszáma/összes mintaszáma (gyakorisága) záró-



**1. ábra** Az rs4143094-es jelzésű SNP külön-külön meghatározott, de az ábrán összesített leolvadási görbéje vastagbélrákos betegpopulációban. Aszimmetrikus PCR. Itt a próba a normál (G)-alléllra specifikus. Ha valamelyik betegmintában csak a normál G/G allél található, akkor a próba szorosan illeszkedik, és magasabb hőmérsékleten olvad le, vagyis a leolvadási fluoreszcens csúcs magasabb hőmérsékleten jelenik meg. Ha a minta homozigóta variábilis T/T allélt tartalmaz, a próba kevésbé szorosan illeszkedik, és alacsonyabb hőmérsékleten olvad le. Heterozigóta genotípus esetén egy magasabb és egy alacsonyabb leolvadási csúcsot látunk

PCR = polimeráz-lánreakció; SNP = egyponos nukleotidpolimorfizmus

**3. táblázat** A vizsgált hat daganathajlamosító SNP genotípusának előfordulási gyakorisága magyarországi, CrC-ben szenvedő betegekben és egészséges egyénekben, összehasonlítva az SNPnexus adatbázisban szereplő hasonló CEU-adatokkal. Az egyes genotípusok mintaszámai a gyakorisági értékek mellett zárójelben szerepelnek. A homozigóta kockázati genotípusokat \* -gal, az előfordulási gyakoriságot **bold**-dal jelöltük, a heterozigóta és normálgenotípusokat nem emeltük ki. Gyakorisági érték: allélfordulás számértéke / összes minta száma

SNP	Genotípus	Normálkontroll	CEU	Vastagbélrák	Esély-hányados	95% CI	Sheskin P	Pearson $\chi^2$ P
		Gyakoriság	Gyakoriság	Gyakoriság				
rs4143094	GG	(25/47) 0,5319	(48/90) 0,5333	(29/47) 0,6170	1,1600	0,5933-2,2681	0,6644	-
	*TG	(19/47) 0,4043	(35/90) 0,3889	(13/47) 0,2766	0,6842	0,3034-1,5429	0,3603	-
	*TT	(3/47) <b>0,0638</b>	(7/90) <b>0,0778</b>	(5/47) <b>0,1064</b>	1,6667	0,3766-7,3729	0,3603	0,6720
rs6983267	*GG	(14/47) <b>0,2979</b>	(34/165) <b>0,2061</b>	(16/47) <b>0,3404</b>	1,1429	0,5016-2,6037	0,7506	0,3583
	*GT	(23/47) 0,4894	(91/165) 0,5515	(22/47) 0,4680	0,9565	0,4699-1,9469	0,2924	-
	TT	(10/47) 0,2128	(40/165) 0,2424	(9/47) 0,1915	0,9000	0,3354-2,4152	0,8343	-
rs9929218	*AA	(3/47) <b>0,0638</b>	(9/163) <b>0,0552</b>	(5/47) <b>0,1064</b>	1,667	0,3766-7,3759	0,5009	0,3236
	*AG	(21/47) 0,4255	(79/163) 0,4847	(15/47) 0,3191	0,7143	0,3287-1,5523	0,3955	-
	GG	(23/47) 0,4894	(75/163) 0,4501	(17/47) 0,5745	0,7391	0,3505-1,5584	0,4271	-
rs16892766	AA	(35/47) 0,7448	(133/165) 0,8064	(39/47) 0,8298	1,4963	0,7951-2,8159	0,2115	-
	*CA	(12/47) 0,2553	(32/165) 0,1939	(6/47) 0,1277	0,9574	0,3379-2,7130	0,9384	-
	*CC	<b>0</b>	<b>0</b>	(2/47) <b>0,0425</b>	5,0000	0,2328-106,9516	0,3031	0,0239
rs3802842	AA	(26/47) 0,5532	(103/165) 0,642	(22/47) 0,4681	0,8462	0,4214-1,6989	0,6385	-
	*CA	(18/47) 0,3830	(51/165) 0,3091	(18/47) 0,3830	1,0000	0,4638-2,1561	1,0000	0,2102
	*CC	(3/47) <b>0,0638</b>	(11/165) <b>0,0667</b>	(7/47) <b>0,1489</b>	2,3333	0,5687-9,5732	0,2394	-
rs10795668	GG	(21/47) 0,4468	(75/165) 0,4545	(19/47) 0,4043	0,9048	0,4314-1,8976	0,7911	-
	*AG	(22/47) 0,4682	(73/165) 0,4424	(22/47) 0,4682	1,0000	0,4887-2,0463	1,0000	-
	*AA	(4/47) <b>0,0851</b>	(17/165) <b>0,0708</b>	(6/47) <b>0,1277</b>	1,5000	0,3974-1,566144	0,5496	0,5499

CEU = Central REuropean Union; CI = konfidenciaintervallum; CrC = colorectalis carcinoma; SNP = egyponos nukleotidpolimorfizmus

**4/A táblázat** | A hat SNP egy személyben egyszerre előforduló kockázati genotípusainak gyakorisági megoszlása vastagbélrákos betegek, illetve nem daganatos kontrollpopuláció DNS-mintáiban. Gyakoriság: a csoport mintaszáma / összes minta

Vizsgálati csoportok	Az egy személyben egyszerre előforduló kockázati genotípusok (KG) száma és gyakorisága				Összes minta
	3 KG mintaszám (gyakoriság)	2 KG mintaszám (gyakoriság)	1 KG mintaszám (gyakoriság)	Nincs KG mintaszám (gyakoriság)	
Vastagbélrákos betegek száma	3 (0,0638)	5 (0,1063)	24 (0,5319)	15 (0,3191)	47
Nem daganatos kontrollok száma	0	3 (0,0638)	17 (0,3617)	27 (0,5745)	47

KG = kockázati genotípus; SNP = egy pontos nukleotidpolimorfizmus

jelben szerepel. A vizsgált magyar 47 nem daganatos populációban és az SNPnexus CEU-populációban mind-egyik SNP-allél előfordulási gyakorisága azonos. Jól látható viszont az a tendencia, hogy minden egyes SNP *homozigóta* kockázati (variábilis) alléja gyakrabban fordul elő vastagbélrákos betegekben, mint a kontroll-, illetve a nem daganatos CEU-populációban, de a különbségek kétféle statisztikai módszerrel sem szignifikánsak. Az rs16892766 jelzésű SNP homozigóta kockázati alléja (a sejtosztódás szabályozását befolyásolja az EIF3H-génen keresztül) egyáltalán nem fordult elő sem a magyar kontroll-, sem az SNPnexus CEU-populációban, de kétszer is megtalálható a CrC-s betegpopulációban. Ezt az előfordulási típust a Pearson-féle  $\chi^2$ -teszttel szignifikáns eltérésnek találtuk. A heterozigóta kockázati allélok egyáltalán nem gyakoribbak daganatos betegekben, mint a normálkontrollokban (3. táblázat).

Megvizsgáltuk, hogy a hat SNP homozigóta kockázati alléja együttesen hogyan oszlik meg egy időben, egy személyben. 47 vastagbélrákos betegünk között 3 esetben is volt olyan személy, akiben egyszerre három, 5 esetben egyszerre két különböző SNP homozigóta kockázati alléja fordult elő, 24 esetben csak 1 valamelyik SNP kockázati allélját találtuk meg, 15 esetben nem volt kockázati allél. A 47 nem daganatos kontrollpopulációban mindössze három személynél fordult elő egyszerre két különböző homozigóta kockázati allél, és 17 mintában volt csupán 1 kockázati allél. A daganatos és a kontrollcsoport SNP-előfordulási gyakoriságai egymástól

**4/B táblázat** | A hat SNP egy vastagbélrákos (kedvezőtlen kimenetelű) személyben egyszerre előforduló kockázati genotípusainak statisztikai összehasonlítása a saját nem daganatos (kedvező kimenetelű) kontrollpopulációval

Vizsgálati csoport	Vastagbélrákos betegek			
	Esély-hányados	95% CI	Sheskin P	Pearson $\chi^2$ P
3 Ka	665,0000	11,3844–38844,6765	0,0017	0,0435
2 Ka	26,1111	4,1183–165,5517	0,0005	–
1 Ka	3,9031	1,6970–2,1286	0,0017	–
0 Ka	0,9771	0,4394–2,1286	0,9337	–

CI = konfidenciaintervallum; Ka = kockázati allél; SNP = egy pontos nukleotid-polimorfizmus

szignifikáns eltérésnek bizonyultak (4/A és 4/B táblázat).

A vastagbélrákos betegek átlagéletkora 63,6 év, a kontrollpopulációé 34 év volt. Ha az összevont normál és heterozigóta kockázati allél genotípusú mintákat hasonlítottuk össze a homozigóta genotípusú mintákkal, az átlagéletkor és a nemek gyakorisági eloszlása mind a 6 SNP-nél csak kis fokú variabilitást, jelentéktelen különbségeket mutatott (61 *versus* 65 év). A továbbiakban összefüggéseket kerestünk a daganat lokalizációja (jobb és bal colonfél) és a KRAS-mutáció előfordulási gyakoriságának eloszlásában. A kedvezőtlen kimenetelű csoportba a homozigóta kockázati allélt hordozó betegeket, a kontrollcsoportba a heterozigóta kockázati allélt hordozó és nem kockázati (normál-) allélt hordozó betegeket soroltuk (5. táblázat). A jobb colonfélre vonatkozó adatok mind a lokalizáció, mind a KRAS-mutáció tekintetében szignifikánsan különböztek a bal colonfélre vonatkozó adatoktól. NRAS-mutáció a 47 daganatos mintában nem fordult elő.

### Megbeszélés

A heterozigóta (HEZ) kockázati allélok egyáltalán nem gyakoribbak daganatos betegekben, mint a normálkontrollokban. Ez a megfigyelés azt jelenti, hogy vizsgálatainkban nem tudtuk igazolni semelyik SNP heterozigóta kockázati genotípusának daganatos hajlamot növelő hatását, ezért a HEZ kockázati allélt hordozó SNP-eket is a kontrollcsoportba soroltuk a kockázati allélt nem hordozó SNP-ekkel együtt.

Mind a hat SNP homozigóta kockázati allél relatív gyakorisági értékei a saját kontrolladatokhoz, illetve a nem daganatos CEU-populációhoz viszonyítva a daganatos betegekben 1,5–2,3-szor gyakrabban fordultak elő, vagyis ezeknek az SNP-knek a kockázati allél-jelenléte függ össze a leginkább az alapértékhez viszonyítva megnövekedett CrC-hajlammal.

Az rs414094-es számú SNP a GATA3-gén szomszédságában található, és befolyásolhatja annak szöveti kifejeződését. A GATA3-gén transzkripció faktoraként működik, és szerepe van a sejtek differenciációjában a sejtproliferáció gátlása és a sejttúlélés meghosszabbítása révén [32]. A GATA3-gén sérülését vagy a génexpressz-

**5. táblázat** | 47 vastagbélrákos beteg. A tanulmányban szereplő hat SNP genotípusainak összefüggése a vastagbélrákok lokalizációjával és a KRAS-mutációval. A statisztikai analízis során a kedvezőtlen kimenetelű csoportba a homozigóta kockázati allélt hordozó betegeket, a kontrollcsoportba a heterozigóta kockázati allélt hordozó és nem kockázati (normál-) allélt hordozó betegeket soroltuk, az SNP-kénti allélgyakoriságokat összevontuk, és így számoltuk a statisztikai szignifikanciát

Összes SNP						
Jobb colonfél		Bal colonfél		Esélyhányados	CI	P
HOZ Ka %	HEZ Ka & Non-Ka %	HOZ Ka %	HEZ Ka & Non-Ka %			
15,4	12,4	84,6	83,5			
Összes %	16,4	83,6		0,2044	0,1421–0,2941	0,0001

wt KRAS		mut KRAS		Esélyhányados	CI	P
HOZ Ka %	HEZ Ka & Non-Ka %	HOZ Ka %	HEZ Ka & Non-Ka %			
53,8	60,3	42,2	39,7			
Összes %	59,4	40,6		1,4619	1,0962–1,9576	0,0098

Gyakoriság: a csoport mintaszáma / összes minta.

CI = konfidenciaintervallum; HEZ Ka & Non-Ka = heterozigóta kockázati allél és nem kockázati (normál-) allél; HOZ Ka = heterozigóta kockázati allél; wt KRAS = vad (normál) típusú KRAS; mut KRAS = mutáns (funkciónyerő mutációt hordoz); SNP = egyponos nukleotidpolimorfizmus

szio más okból történő megszűnését vastagbél-, emlő- és tüdőrákokban leírták [33]. A továbbiakban *Figueiredo és mtsai* [17] GWAS-tanulmány keretében kimutatták a 10p14-es kromoszómaregióban lévő SNP-k összefüggését táplálkozási faktorokkal, illetve azt, hogy magas hőmérsékleten megsütött vörös hús fogyasztása megnövekedett vastagbélrák-kockázattal jár. *Hansen és mtsai* [35] igazolták, hogy az ugyancsak 10p14-es kromoszómaregióban lévő rs414094-es SNP homozigóta T/T variáns allélja mutat statisztikailag szignifikáns összefüggést a vöröshús-fogyasztással és megemelkedett CrC-kockázattal. *Alexander és mtsai* [14] szorosabb összefüggésre mutattak rá a vöröshús-evés és a rectumcarcinoma előfordulása között. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a vastagbél különböző szakaszainak (jobb és bal colonfél, valamint rectum) daganatai eltérő patogenezissel rendelkeznek, következésképpen a táplálkozási faktorok az anatómiai hely függvényében eltérően befolyásolják a CrC kialakulását. Itt jegyezzük meg, hogy mind a 6 SNP sokkal gyakrabban fordul elő a bal colonfélben, mint a jobban, vagyis hatásmechanizmusuk különbözik a magas fokú mikroszatellitainstabilitással (MSI-H) járó vastagbélrák-szindrómákétól. Ezt támasztja alá saját korábbi, 469 örökletes és sporadikus vastagbélrákon végzett vizsgálatunk is, amelyben a Lynch-szindróma jobb-colonfél-lokalizációját 90,5%-nak, a (MLH1-promóter CpG hipermetilációja okozta időskori sporadikus CrC) jobb-colonfél-lokalizációját pedig 100%-nak találtuk (az adatokat részletesen nem mutatjuk).

Szintén a 10p14-es kromoszómaregióban előforduló rs10795668-as jelű SNP-re vonatkozóan legújabban *Jenkins és mtsai* [24] kimutatták, hogy variábilis alléljának jelenléte megemelkedett vastagbélrák-kockázattal jár. Saját vizsgálatunkban ezen SNP A/A genotípusa

1,5–1,8-szor gyakrabban fordult elő olyan betegekben, akikben vastagbélrák alakult ki, mint az egészséges saját kontroll- vagy a CEU-populációban. *Jacobs és mtsai* [36] amerikai populációra vonatkozó tanulmányukban azt feltételezik, hogy a hajlamosító SNP-k daganatkockázat-növelő hatása a táplálkozási szokások és az életstílus megváltozásával időben fokozatosan csökken.

Az rs6983267-es szekvenciavariáns a Wnt-szignál transzkripció aktivitására hat (1. táblázat), homozigóta G/G kockázati alléljának csak kevéssel több előfordulását találtuk daganatos betegeink mintáiban, saját kontrollmintáinkban, a CEU-populációhoz viszonyítva azonban ennek a kockázati allélnek a relatív gyakorisága az irodalmi adatoknál is magasabb értéket mutatott (1,65×). Ugyanennél az SNP-nél *Tuupanen és mtsai* [21] nagyszámú finn mintán kimutatták, hogy a homozigóta G/G genotípus 1,48-szoros, és saját adatainkkal ellentétben a heterozigóta G/T genotípus 1,21-szeres kockázatnövekedést okoz. Az Egyesült Királyságban ugyanennél az SNP-nél csaknem azonos CrC-kockázat-növekedést találtak G/G (1,47×) és G/T (1,27×) genotípusoknál [22]. Saját CrC-s mintáink között a heterozigóta G/T allélvariáció a fent említettekkel ellentétben nem fordult elő gyakrabban, mint a kontrollpopulációban, vagyis nem növelte a vastagbélrák-kockázatot.

Az rs3802842-es jelzésű SNP a 11q23-as kromoszómaregió ellentétes DNS-szálán a COLCA2-gén (colorectal cancer-associated gene 2) szabályozó régiójában van, és variábilis allélja ennek működését befolyásolja. A COLCA2-gén 154–379 aminosavból álló fehérjeizozformákat kódol, amelyeket hám-, myeloid, lymphoid és mesenchymalis sejtek citoplazmájában, továbbá CrC-ben mutattak ki, vagyis az egyik fehérjeizozforma közvetlen hatással van a vastagbélrák kialakulására [37]. Tovább-

bi tanulmányokban kimutatták, hogy az rs3802842-es variábilis C-alléja mutat szoros összefüggést vastagbélrákkal, és a variábilis allélt tartalmazó betegek carcinomái gyakrabban fordultak elő a rectumban, mint a colonban [25, 29, 31]. Adataink szerint az rs3802842-es C/C variábilis alléja mutatta a saját kontroll- és a CEU-populációhoz viszonyított legmagasabb előfordulási arányt CrC-s betegek vizsgálati mintáiban (2,33-szoros és 2,23-szoros növekedés).

Az rs9929218-as SNP 160 bázissal előzi meg a CDH1-gén promóter transzkripció starthelyét. A CDH1 (E-cadherin)-gén kalciumion-függő adhéziós molekulát kódol, amely erősen befolyásolja a gyomor- és vastagbélrákok szövettani képét (fenotípusát) [27]. Az SNP variábilis A-alléja hatással van az E-cadherin-gén expressziójának szabályozására, illetve az adhéziós molekula funkciójára. Több publikációban is kimutatták ennek az SNP-nek a CrC-kockázat-növelő hatását [25–27], amivel saját megfigyeléseink is megegyeznek, vagyis az A/A allél szekenciavariációját tartalmazó minták jóval gyakrabban származnak daganatos betegekből, mint a saját egészséges kontrollbetegeinkből vagy a CEU-adatbázisból.

Az rs16892766-os SNP az EIF3H (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H) olyan 37 gént tartalmazó csoport tagja, amely szükséges a sejtosztódáshoz [29, 38]. E géneknek nagyszámú RNS-összeillesztési (splice) variánsa van, amelyek létrejöttére az rs16892766-os variábilis alléja gyakorol hatást. Egyes allélváltozatok a sejtosztódási orsó defektusát és ezen keresztül a sejt genetikai instabilitását okozzák, ami a legtöbbször a Wnt-szignálút károsodásához vezet. *Peters és mtsai* [30] kimutatták, hogy több SNP mellett az rs16892766-os szoros összefüggést mutat vastagbéladenomák és még inkább -carcinomák kialakulásával. Saját anyagunkban az rs16892766-os C/C kockázati alléja összesen két, CrC-ben szenvedő betegben fordult elő, és nem volt megtalálható sem a saját kontroll-, sem a CEU-populációban, ami szignifikáns különbséget jelent. A heterozigóta C/A allél genotípusú minták viszont semelyik kontrollpopulációhoz viszonyítva nem fordultak elő gyakrabban a vizsgált CrC-s betegek között, ami azt jelzi, hogy csak a homozigóta C/C allél jelenléte jelent megnövekedett rákkockázatot.

Felmerül a kérdés, hogy esetünkben a CrC-s és a nem daganatos kontrollcsoport 47-47-es mintaszáma elegendő-e megfelelő következtetések levonására. A vastagbélrákos csoportnál egy nagyságrenddel nagyobb mintaszámmal a GWAS-vizsgálatok dolgoztak, amelyet 10–20 nagy intézet adott össze, mégis saját eredményeink – ahogyan fentebb bemutattuk – az itt közölt adatokhoz nagyon hasonlítanak, mintaszámunk tehát alkalmas megfelelő következtetés levonására. A kontrollcsoportban az egyes allélok előfordulási gyakorisága a nagyobb mintaszámú SNPnexus HapMap CEU-ra vonatkozó adatbázisának allélgyakoriságával teljesen azonos (vö. 3.

táblázat), vagyis a kontrollcsoport mintaszáma is elfogadható.

A vastagbélrákos betegek átlagéletkora 63,6 év, a kontrollpopulációé 34 év volt.

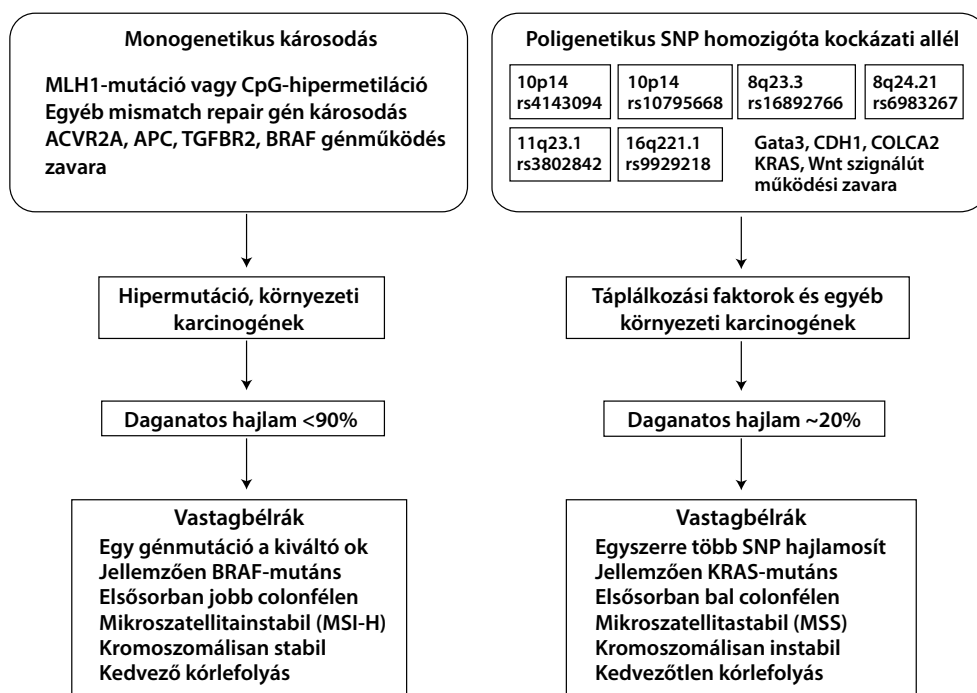
Ez a jelentős életkorbeli különbség a két vizsgálati csoport között megítélésünk szerint azért nem okozott problémát, mert itt nem a daganat kialakulásának, hanem az SNP-k genetikai előfordulásának gyakoriságát vizsgáltuk. Megjegyezzük továbbá, hogy az egyes allélok előfordulási gyakorisága a nagyobb mintaszámú és idősebb embereket is magában foglaló SNPnexus HapMap CEU-ra vonatkozó adatbázisában teljesen azonos a saját kontrolladatbázisunkéval (3. táblázat).

A The Cancer Genome Atlas Network konzorcium az eddigi ismeretek nagyon részletes összefoglalóját publikálta a colon- és rectumcarcinoma genetikájáról [2]. Az itt közölt adatok figyelembevételével értékeltük az örökletes SNP-knek a vastagbélrák-kialakulás kockázatát növelő hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy mindegyik vizsgált SNP homozigóta kockázati allél variációja a közelükben elhelyezkedő gének megzavart működésén keresztül fejti ki hatását, ami inkább a nem hipermutáns vastagbélrákoknál és nem a monogénes (hipermutáns) betegségeken keresztül érvényesül, mert hatásuk nem vezet a genom azonnali mikroszatellitainstabilitásához. A vastagbélrákok lokalizációjára vonatkozó adataink is a fentieket igazolják (2. ábra). A daganatos, valamint a nem daganatos kontrollpopulációban a 6 SNP homozigóta kockázati genotípusának személyenkénti megoszlása egymástól szignifikánsan eltér. Valamely vastagbélrákos betegben ugyanis egyszerre több SNP kockázati allél genotípusa lehet jelen, mint egy kontrollpopulációhoz tartozó személyben, azaz a kockázat mértéke személyre van szabva. Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy a genom újabban megismert és alacsony penetranciával örökklődő szekenciavariációi reálisan, személyre szabotlan, de legfeljebb 20%-os valószínűséggel befolyásolják a vastagbélrák kialakulásának kockázatát (2. ábra).

### *Az SNP-kkel összefüggő genetikai tesztek információtartalma és haszna*

Az utóbbi években a populációs alapú GWAS-vizsgálatok sok olyan genetikai variációt (SNP) tártak fel, amelyek komplex betegségekkel függenek össze, beleértve a daganatos betegségeket is, azonban az ilyen szekenciavariációknak önmagukban a betegség kialakulására rendszerint csak kis hatásuk van, vagy a hatásuk ismeretlen. Ezért a genetikai daganathajlamosító tesztek eredményét *Galvan és mtsai* [6] szerint szélesebb összefüggésbe kell helyezni, figyelemmel az előzetes daganatos történésekre, továbbá az életstílusbeli és/vagy környezeti adatokra. Tekintettel arra, hogy a daganathajlamosító SNP-k az összes SNP igen kis hányadát teszik ki, ha csupán ezeket nézzük, csak részleges képet kapunk az adott betegség kialakulásának egyedi kockázatáról. Ezért egy SNP által jelzett nagyobb genetikai kockázat nem azt jelenti,





2. ábra

Az örökletes vagy sporadikus monogén betegségek és az örökletes poligén SNP-variációk összehasonlító modellje a vastagbélrák-kialakulás kockázata egyedi predikciójának szemszögéből. Vagy egyetlen génben keletkezhet daganatkialakulással összefüggő mutáció (monogenetikus szindróma), vagy több gént érintő örökletes szekenciavariációk (poligenetikus SNP-k) egyedi rákra hajlamosító állapotot hoznak létre normál-vastagbélhámsejtben. A továbbiakban érvényesülhet a kialakult monogenetikus szindróma erős rákokozió hatása például Lynch-szindróma vagy az MLH1-gén promóter hipermetilációja által kiváltott időskori sporadikus CrC esetén. Az örökletes poligén SNP homozigóta kockázati alléljainak rákra hajlamosító hatása kiegészül környezeti rákkeltő faktorok hatásával, amit a kromoszómális (genetikai) instabilitás segít elő. A felszaporodó mutációk darwini szelekcióra emlékeztető soklépcsős folyamat következtében valamelyik daganatkeletkezés szempontjából esszenciális szignálútnak a szabályozását úgy módosíthatják, hogy az végül is vastagbélrák kialakulásához vezethet

CrC = colorectalis carcinoma; SNP = egy pontos nukleotidpolimorfizmus

hogy az adott daganat feltétlenül kialakul, vagy egy kisebb genetikai kockázat nem jelenti azt, hogy a daganatos betegség kialakulása egyáltalán nem várható. Azt is meg kell azonban jegyezni, hogy a daganathajlamosító szekenciavariációk vizsgálata elősegíti az emberi daganatok kialakulásának jobb megértését és prevencióját.

### Az SNP-alapú genetikai tesztek klinikai jelentősége

1. Az SNP-alapú genetikai teszt nem daganatdiagnosztikus teszt, nem mondja meg, hogy a daganat a jövőben kialakul-e, és nem utal a betegség esetleges kialakulásának időbeliségére.
2. Többféle SNP hajlamosító szekenciavariációjának együttes előfordulásakor személyre szabott kumulatív kockázati becslés adható, így lehetőség van egyedi betegkövetési eljárás kidolgozására, mint például az érintett személy részvételére szűrővizsgálatokban.
3. A genetikai hajlamosító teszt végzésének eredményeképpen személyre szabottan javasolhatjuk a táplálkozási szokások megváltoztatását annak érdekében, hogy a meglévő daganatos kockázatot csökkentsük.

4. A genetikai hajlamosító teszt eredménye egyedi, ezért nem vonatkozhat a családtagokra.
5. A genetikai hajlamosító tesztek a felnőtt lakosság informálására szolgálnak. A pszichés tényezőket is figyelembe véve a vizsgálat valós értékének hangsúlyozásával kell az érintetteket megfelelő szakemberek segítségével tájékoztatni.

*Anyagi támogatás:* A munka a KMR\_12-1-2012-0125. számú pályázat, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap finanszírozásával valósult meg.

*Szerzői munkamegosztás:* A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a cikk elkészítéséhez. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

*Érdekltségek:* A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők megköszönik Götzer Katalin és Varga Tünde biológus asszonyoknak a genetikai vizsgálatokban nyújtott fontos segítséget, továbbá Gaudi Istvánnak a statisztikai analízist.

## Irodalom

- [1] Available from: [http://www.onkol.hu/hu/nemzeti\\_rakregiszter](http://www.onkol.hu/hu/nemzeti_rakregiszter)
- [2] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330–337.
- [3] Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2014; 27: 9–14.
- [4] Donehower LA, Creighton CJ, Schultz N, et al. *MLH1*-silenced and non-silenced subgroups of hypermutated colorectal carcinomas have distinct mutational landscapes. *J Pathol.* 2013; 229: 99–110.
- [5] Szentirmay Z, Gallai M, Serester O, et al. Correlation between microsatellite instability and morphology in colorectal cancer. [A microsatellita-státus és a morfológiai kép összefüggése vastagbélrákokban.] *Magy Onkol.* 2010; 54: 169–178. [Hungarian]
- [6] Galvan A, Ioannidis JP, Dragani TA. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends Genet.* 2010; 26: 132–141.
- [7] Varghese JS, Easton DF. Genome-wide association studies in common cancers – what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20: 201–209.
- [8] COGENT Study. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet.* 2008; 40: 1426–1435.
- [9] Cheng TH, Gorman M, Martin L, et al. Common colorectal cancer risk alleles contribute to the multiple colorectal adenoma phenotype, but do not influence colonic polyposis in FAP. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23: 260–263.
- [10] Esteban-Jurado C, Garre P, Vila M, et al. New genes emerging for colorectal cancer predisposition. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 1961–1971.
- [11] World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington DC, 2007.
- [12] Sinha R. Single-nucleotide polymorphisms relevant to meat consumption and cancer risk. In: Stewart BW, Wild CP. (eds.) *World Cancer Report 2014. 2.6: Diet, obesity, and physical activity.* International Agency for Research on Cancer, Nonserial Publication, Lyon, 2014; pp. 128–129.
- [13] Steck SE, Butlerb LE, Kekuc T, et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms, meat intake and colon cancer risk. *Mutat Res.* 2014; 762: 24–31.
- [14] Alexander DD, Weed DL, Miller PE, et al. Red meat and colorectal cancer: a quantitative update on the state of the epidemiologic science. *J Am Coll Nutr.* 2015; 34: 521–543.
- [15] Bernstein AM, Song M, Zhang X, et al. Processed and unprocessed red meat and risk of colorectal cancer: analysis by tumor location and modification by time. *PLoS ONE* 2015; 10: e0135959.
- [16] Azeem S, Gillani S W, Siddiqui A, et al. Diet and colorectal cancer risk in Asia – a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16: 5389–5396.
- [17] Figueiredo JC, Li H, Hutte CM, et al. Genome-wide diet-gene interaction analyses for risk of colorectal cancer. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004228.
- [18] Nagle CM, Wilson LF, Hughes MC, et al. Cancers in Australia in 2010: attributable to the consumption of red and processed meat. *Aust NZ J Public Health* 2015; 39: 429–433.
- [19] Dayem Ullah AZ, Lemoine NR, Chelala C. SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update). *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Web Server issue): W65–W70.
- [20] Dayem Ullah AZ, Lemoine NR, Chelala C. A practical guide for the functional annotation of genetic variations using SNPnexus. *Brief Bioinform.* 2013; 14: 437–447.
- [21] Tuupainen S, Niittymäki I, Nousiainen K, et al. Allelic imbalance at rs6983267 suggests selection of the risk allele in somatic colorectal tumor evolution. *Cancer Res.* 2008; 68: 14–17.
- [22] Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet.* 2007; 39: 984–988.
- [23] Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2007; 39: 989–994.
- [24] Jenkins MA, Makalic E, Dowty JG, et al. Quantifying the utility of single nucleotide polymorphisms to guide colorectal cancer screening. *Future Oncol.* 2016; 12: 503–513.
- [25] Houlston RS, Webb E, Broderick P, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet.* 2008; 40: 1426–1435.
- [26] Hoskins JM, Ong PS, Keku TO, et al. Association of eleven common, low-penetrance colorectal cancer susceptibility genetic variants at six risk loci with clinical outcome. *PLoS ONE* 2012; 7: e41954.
- [27] Li LC, Chui RM, Sasaki M, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res.* 2000; 60: 873–876.
- [28] Abulí A, Castells A, Bujanda L, et al. Genetic variants associated with colorectal adenoma susceptibility. *PLoS ONE* 2016; 11: e0153084.
- [29] Ghorbanoghli Z, Nieuwenhuis MH, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Colorectal cancer risk variants at 8q23.3 and 11q23.1 are associated with disease phenotype in *APC* mutation carriers. *Familial Cancer* 2016; 15: 563–570.
- [30] Peters U, Jiao S, Schumacher FR, et al. Identification of genetic susceptibility loci for colorectal tumors in a genome-wide meta-analysis. *Gastroenterology* 2013; 144: 799–807.e24.
- [31] Pittman AM, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. Refinement of the basis and impact of common 11q23.1 variation to the risk of developing colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 3720–3727.
- [32] Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J Cellular Physiol.* 2010; 222: 42–49.
- [33] Zheng R, Blobel GA. GATA transcription factors and cancer. *Genes Cancer* 2010; 1: 1178–1188.
- [34] Aquiles Sanchez J, Pierce KE, Rice JE, et al. Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *PNAS* 2004; 101: 1933–1938.
- [35] Hansen RD, Sorensen M, Tjonneland A, et al. *XPA* A23G, *XPC* Lys939Gln, *XPD* Lys751Gln and *XPD* Asp312Asn polymorphisms, interactions with smoking, alcohol and dietary factors, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res.* 2007; 619: 68–80.
- [36] Jacobs ET, Thompson PA, Martinez ME. Diet, gender, and colorectal neoplasia. *J Clin Gastroenterol.* 2007; 41: 731–746.
- [37] Peltekova VD, Lemire M, Qazi AM, et al. Identification of genes expressed by immune cells of the colon that are regulated by colorectal cancer-associated variants. *Int J Cancer* 2014; 134: 2330–2341.
- [38] Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 2004; 432: 1036–1040.

(Szentirmay Zoltan dr.,  
Budapest, Ráth Gy. u. 7–9., 1122  
e-mail: szentirmay@oncol.hu)