



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar

Genetikai faktorok vizsgálata emlőrákban

Molnár Zsófia
Info-Bionics Engineering MSc

2022

Témavezető: Dr. Garay Tamás Márton

Tartalomjegyzék

1. Kivonat	3
2. Irodalmi bevezetés	5
2.1. Az emlőrák	5
2.1.1. Az emlőrák biológiai háttere	5
2.1.2. Az emlőrák osztályozása	6
2.1.3. Az emlőrák szubtypusai	6
2.2. Patológiai minták feldolgozása	7
2.2.1. Nukleinsavak izolálása	7
2.2.2. RNS izolálás	8
2.3. Sejtvonalak szerepe	8
2.4. Genetikai faktorok	9
2.4.1. Háztartási gének	10
2.5. Célkitűzések	10
3. Alkalmazmazott módszerek	11
3.1. FFPE mintákon végzett eljárások bemutatása	11
3.1.1. Beteganyag	11
3.1.2. RNS izolálás FFPE mintákból	12
3.1.3. RNS mennyiség és minőség ellenőrzésére alkalmazott eljárások	13
3.1.4. NanoString nCounter rendszer	13
3.1.5. NanoString nCounter mérések kiértékelésének módszerei	14
3.2. Sejtes vizsgálatok	15
3.2.1. Sejtvonalak	15
3.2.2. SRB assay	16
3.2.3. SRB mérések kiértékelésének folyamata	17
3.2.4. RNS izolálás sejtvonalakból	17
3.2.5. TaqMan assay	17
4. Eredmények és értékelésük	19
4.1. FFPE minták eredményei	19
4.1.1. RNS izolálás kiértékelése	19
4.1.2. NanoString nCounter mérések kiértékelése	20
4.1.3. Génexpresszió és túlélés közti összefüggések irodalmi adatokkal történő összevetése	22

4.2. Sejtes vizsgálatok eredményei	22
4.2.1. SRB assay eredmények	23
4.2.2. RNS izolálás és TaqMan assay eredményei	23
4.3. Kapcsolat a génexpresszió és az életképesség között	24
5. Összegzés	25

1. Kivonat

Az emlőrák nőknél világszerte az egyik leggyakrabban előforduló rosszindulatú daganat. Hatékony kezelésében segíthetnek azon genetikai faktorok, amelyek kapcsolatban állnak a tumorok kialakulásával, progressziójával, vagy a kezelésre adott szerrel szembeni rezisztencia kialakulásával. Habár már több ilyen emlőrákra specifikus genetikai faktor is ismert, kutatásuk az alkalmazott technológiák fejlődésével egyre pontosabbá válhat, így nem csak új genetikai faktorokat fedezhetünk fel, hanem az eddigi kutatások eredményeit is tovább validálhatjuk. A biomarkerek kutatásával még mélyebben megérthetjük a tumorok biológiai hátterét és működését.

A jelenlegi kutatásban hét olyan gént vizsgáltam, amelyek az emlőben lejátszódó tumoros folyamatokkal és a doxorubicinnel szemben mutatott érzékenységgel kapcsolatba hozhatók, így potenciális prognosztikus vagy prediktív markerek lehetnek. Munkám során FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded – formalinnal fixált paraffinba ágyazott) mintákból izoláltam RNS-t, majd ezen mintákban NanoDrop spektrofotométer és Qubit fluoriméter segítségével szekvenciafüggetlen módon meghatároztam az össz-RNS koncentrációt és RNS minőséget. Ezt követően a kiválasztott gének expressziós mintázatait vizsgáltuk a NanoString nCounter rendszerrel. Az így mért expressziós adatok és a betegek klinikai adatai alapján statisztikai módszerek segítségével meghatároztuk azokat a géneket, amelyek összefüggésben állnak a betegek teljes túlélési idejével vagy az áttétek megjelenésével.

NanoString vizsgálati eredményeinket hét különböző emlőrákos sejtvonalon végzett *in vitro* vizsgálatainkkal validáltuk. Mindegyik sejtvonalból RNS-t izoláltam, majd mennyiség és minőségellenőrzést (NanoDrop spektrofotométer) követően TaqMan RT-qPCR vizsgálatot végeztünk rajtuk a hét kiválasztott génre. Emellett megvizsgáltuk a sejtvonalak doxorubicin érzékenységét SRB-assay segítségével. A sejtvonalak között mind doxorubicin-érzékenység, mind génexpresszió tekintetében találtunk eltéréseket, ami lehetőséget adott annak vizsgálatára, hogy az egyes gének expressziója összefüggésbe hozható-e a sejtek doxorubicin érzékenységével. Ehhez a sejtvonalakat altípusokra osztottuk GI50 érték ("érzékeny"- "nem érzékeny" csoportok) és a sejtvonal kiindulásául szolgáló tumor feltételezhető prognózisa ("RP: rossz prognózis"/"JP: jó prognózis") alapján. Sejtes vizsgálataink során összefüggést tapasztaltunk az IL6ST, ELOVL5 és ACOT13 gének expressziója és a sejtvonalak doxorubicinérzékenysége, feltételezhető malignitása között. Továbbá, a kapott eredmények az IL6ST esetén megerősítették a beteganyagon végzett mérések eredményeit.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Garay Tamásnak, aki szakértelmével és hasznos magyarázataival, tanácsaival járult hozzá a dolgozat elkészüléséhez. Köszönöm a laborban dolgozó hallgatótársaimnak, kiemelten Görög Daniellának fáradhatatlan segítségét és munkáját a sejtvonalas kísérletek során.

Továbbá köszönöm Dr. Herold Zoltánnak (Semmelweis Egyetem, Belgyógyászati és Onkológiai Klinika) az adatelemzésben nyújtott hatalmas segítséget és tanításomra fordított időt. Köszönetet mondok Dr. Szász Attila Marcellnek (Semmelweis Egyetem, Belgyógyászati és Onkológiai Klinika), aki biztosította a munkámhoz szükséges mintákat és adatokat, illetve munkatársainak azon mérések elvégzését, amelyeken nem tudtam jelen lenni. Végül pedig szeretném megköszönni Dr. Péterfia Bálint Ferencnek (PPKE, ITK) is kitartó segítségét a primerek megtervezésekben.

2. Irodalmi bevezetés

Az alábbi fejezetben a kutatásomhoz kapcsolódó szakirodalmról igyekeztem egy átfogó képet adni. Mivel a témámhoz kapcsolódó kutatások száma rendkívül nagy, ezért célom a szakirodalom körvonalazása, egyes kutatások eredményeinek bemutatása.

2.1. Az emlőrák

Az emlőrák nők körében az egyik legelterjedtebb rosszindulatú daganat, főként a nyugati országokban, Amerikában egyes felmérések szerint minden 8. nőt érint élete során [1]. Ázsiában és Afrikában regisztrálják átlagosan a legkevesebb esetet, ugyanakkor ezen a helyeken a túlélési ráta nagyon alacsony [1]. Az emlőrák kutatása a többi rákhoz hasonlóan kiemelkedő fontosságú, habár egyes típusai ma már jól kezelhetők és a betegek túlélési ideje is átlagosan növekszik a korai felismerés és a kezelések javulása miatt [2].

Magyarországon 2019-es statisztikák szerint nők körében a 2. leggyakoribb ráktípus közé tartozik. Férfiaknál is előfordul, azonban sokkal ritkábban. A Nemzeti Rákregiszter statisztikái alapján 2015 és 2019 között Magyarországon évente átlagosan körülbelül 9132 nőt és 230 férfit diagnosztizáltak a betegséggel. A diagnosztizált betegek száma évről évre nőtt, ez több dolgot is jelenthet, egyrészt nőhet a betegek száma, azonban azt is mutathatja, hogy egyre sikeresebb módszerek vannak a korai felismerésére, amely nagyon fontos az emlőrák esetében.

Emellett 2018-as és 2019-es statisztikák szerint Európán belül Magyarországon az egyik legmagasabb a halálozási aránya a rosszindulatú emlődaganatoknak [3], ami nagyjából minden 100000 főből 40 embert jelent [4]. Amerikában készült felmérések is azt írják, hogy az egyik leggyakoribb rákfajta nőknél és a második leggyakoribb halálozási ok, a tüdőrák után csak az egyes ráktípusok halálozási rátáját tekintve [5].

További amerikai kutatások szerint a betegek korának eloszlását tekintve azt lehet elmondani, hogy leggyakrabban a 70 év felettieket érinti, de 50 éves kor felett is már számottevő a betegek száma [2]. Illetve a fiatal kori emlőrák általában rosszabb prognózisú, mint az idősebb kori. A fiatalok vége nem teljesen tisztázott, a legtöbb tanulmányban 40 éves kortól tekintik, ugyanakkor van ahol 35 vagy ennél is alacsonyabb a határ [6], [7].

2.1.1. Az emlőrák biológiai háttere

Emlőrák kialakulásához számos ok vezethet, vannak olyan tényezők, amelyek bizonyítottan közrejátszhatnak ebben. Egyik legnagyobb kockázati faktor a genetikában rejlik. A nők körében ugyanis sokkal gyakrabban alakul ki a betegség, mint már említettem az előző részben.

Genetikai szempontból még számít a családi háttér (közvetlen rokon, akit mellrákkal diagnosztizáltak) és az egyes mutációk is (pl. BRCA1 mutáció) növelhetik a kialakulás esélyét [8]. Az etnikum is befolyásolhatja az emlőrák kialakulását és típusát, például egyes kutatások szerint a fehér nőkben gyakrabban alakul ki, mint a fekete vagy ázsiai nők körében, viszont fekete nőknél nagyobb esély van agresszívebb, gyorsabban progresszív rák kialakulására [2]. Külső tényezők is növelhetik a kockázatot, ilyenek például a dohányzás, az elhízás, túlzott alkoholfogyasztás és a mozgásszegény életmód [9]. Összességében ezek a tényezők növelhetik a kialakulás esélyét, de egy tumor kialakulásához nem elengedhetetlen ezek megléte, ezért minden esetben fontosak a szűrővizsgálatok, amelyekről a későbbiekben fogok bővebben beszélni.

Az emlő rosszindulatú daganatait eredetük alapján alapvetően két fő csoportra tudjuk osztani. Karcinómának nevezzük a hámeredetű (epiteliális) rákos daganatokat, amelyek a rosszindulatú daganatok körülbelül 90%-át teszik ki. A kötőszöveti eredetű rákos daganatok összefoglaló neve szarkóma. A rosszindulatú emlődaganatok többsége hámeredetű, invazív karcinóma, ezen belül a két leggyakoribb típus az invazív duktális és lobuláris karcinóma, amelyek körülbelül 75% és 15%-a az összes rosszindulatú emlődaganatnak az Egyesült Államokban [10]. A maradék 10%-ba tartoznak további invazív karcinómák és *in situ* karcinómák [11]. Ezen kívül a mellrákot nagyon sokféleképpen lehet osztályozni, többek között klinikai jellemzők vagy különféle tumormarkerek expresszálása alapján [11].

2.1.2. Az emlőrák osztályozása

Az emlőrákot eleinte egy betegségként fogták fel, változatos hisztopatológiai tulajdonságokkal és kezelésekre adott válaszokkal. Az 1970-es években azonban elkezdtek két betegség alcsoportra osztani az ösztrogén receptor (ER - estrogen receptor) expressziója alapján, tekintettel az egyéb klinikai jellemzőkre [12]. Manapság az osztályozása elkülönül különböző kritériumok és célok szerint is. A legfontosabb kategorizálása a hisztopatológiai típusa, a tumor fokozata (grade), a tumor stádiuma (stage) és a fehérje-, illetve génexpresszió alapján történik. Ahogyan nő a tudásunk a sejt- és tumorbiológiáról, úgy egyre jobban fejlődik az osztályozása is. Ennek egyik legfontosabb célja a lehető legjobb kezelés kiválasztása a betegek számára [12], mivel egy adott kezelés nem feltétlenül ugyanolyan hatékony a különböző emlőrákos elváltozások esetén.

2.1.3. Az emlőrák szubtípusai

Az emlőrákot több szempontból szokták osztályozni, ebben az alfejezetben a receptorok szerinti szubtípusokat mutatnám be. A receptok státuszát hagyományosan az egyes receptorok (ER, PR, HER2) vizsgálatával osztályozták, de újabb megközelítések ezzel együtt a tumor gradet is figyelembe veszik, hogy több molekuláris altípusra oszthatóvá váljon, amelyeknek különböző prognózisuk és eltérő válaszaik lehetnek az egyes kezelésekre [10], [13]. Az expresszált gének szempontból négy fő csoportot különböztethetünk meg (2.1 táblázat).

Molekuláris szubttípus	Luminális A	Luminális B		Her2 pozitív	Basalis
		Luminális B1	Luminális B2		
Biomarkerek	ER+	ER+	ER+	ER-	ER-
	PR+	PR-	PR-/+	PR-	PR-
	HER2-	HER2-	HER2+	HER2+	HER2-
	Ki67 alacsony	Ki67 magas	Ki67 magas	Ki67 magas	Ki67 magas
Esetek gyakorisága (%)	40-50	20-30		15-20	10-20
Szöveti osztályozás (grade)	Jól differenciált (Grade I)	Mérsékelten differenciált (Grade II)		Alacsonyán differenciált (Grade III)	Alacsonyán differenciált (Grade III)
Prognózis	Jó	Közepes		Rossz	Rossz
Terápiás válasz	Endokrin	Endokrin Kemoterápia	Endokrin Kemoterápia Célzott terápia	Célzott terápia Kemoterápia	Kemoterápia

ER: ösztrogén receptor (estrogen receptor), PR: progeszteron receptor (progesterone receptor), HER2:

2.1. táblázat. Az emlőrák molekuláris szubttípus szerinti osztályzásának összefoglalása [14]–[17]

Látható, hogy a szubttípusok mennyire különbözők molekuláris szinteken, és emiatt a kezelések hatékonysága is eltérhet köztük. Az ösztrogén és progeszteron receptorok és a humán epidermális növekedési faktor 2 receptor (HER2) már régóta ismert biomarkerek, évek óta hatalmas szerepük van az endokrin terápiákra alkalmas betegek kiválogatásában [18]. Ezeken kívül manapság a Ki-67 fehérje szintjét is egyre gyakrabban vizsgálják, ugyanis ez is bír egy mérsékelt prognosztikai értékkel [19]. A biomarkerek kutatása segíti a betegek hatékonyabb kezelését, emellett pedig hozzájárul ahhoz is, hogy jobban megismerjük az emlőtumorok molekuláris működését. A mellrák kezelése az elmúlt évtizedekben számos változáson ment keresztül, ez részben köszönhető a prognosztikus és prediktív biomarkerek pontosabb meghatározásának is, mivel ezek lehetővé tették személyre szabottabb terápiákat, például a különböző szubttípusok szerint [18], [20].

2.2. Patológiai minták feldolgozása

A műtétek során eltávolított tumorokat fixálják, beágyazzák, metszik, majd diagnosztikai célhoz megfelelő festési eljárás után vizsgálják. A leggyakrabban alkalmazott eljárás a formalin fixálás, majd paraffinba ágyazás, ezeket a mintákat röviden FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) mintáknak nevezzük [21]. Azonban a klinikumban nincs egységes protokoll a formalin fixálásra, így számos különböző módszer változat terjedt el.

Szólnak ezen kívül érvek és ellenérvek az FFPE minták klinikai diagnosztikához való használatára, egyes kutatások szerint a formalin RNS roncsoló hatással bír [22], [23]. Ezekkel szemben számos olyan kutatás született, amelyek szerint az FFPE minták alkalmasak biológiai kutatásokhoz előnyös tulajdonságaik miatt, többek között mennyiségük, ami rendkívül hasznos lehet biológiai és orvosi kutatásokhoz, ahol fontos az elegendő minta a statisztikailag alátámasztott vizsgálatok készítéséhez, illetve lehetőséget biztosít a kísérletek megismétlésére is [24], [25]. Emellett az FFPE minták előnye a fagyasztott mintákhoz képest, hogy tárolásuk sokkal egyszerűbb és kevesebb energiát igényel, illetve sokrétűbb a felhasználhatóságuk [24]. Mindezek miatt az FFPE minták jelentik az egyik leggyakrabban használt mintatípusok a klinikai kutatásokhoz [26], [27].

2.2.1. Nukleinsavak izolálása

A nukleinsavak hatékony izolálása meghatározó jelentőségű a génexpresszió vizsgálatához, polimeráz láncreakcióhoz (PCR) és szekvenáláshoz is. Manapság már nagyon sok technika lé-

tezik nukleinsavak izolálására. Ezeknek közös tulajdonsága, hogy az izolálni kívánt mintából el kell távolítani a más jellegű makromolekulákat (például fehérjéket, lipideket, szénhidrátokat). A legtöbb módszer 3 fő lépésre bontható: először kivonjuk vagy felszabadítjuk a nukleinsavat a sejtekből, ezt követi a nukleinsav izolálása vagy szeparációja a többi makromolekulától, majd legvégül a nukleinsav tisztítása következik, hogy az egyéb a további vizsgálatokat zavaró molekulákat is eltávolítsuk [28]. Valamint a folyamat során meg kell akadályozni a nukleinsavakat bontó enzimek (nukleázok: RNáz, DNáz) működését is [29].

A hagyományos módszerek számos olyan vegyszerek használatát igénylik, amelyek az emberi egészségre károsak (például fenol, kloroform). Ezeknek a módszereknek a lényege, hogy a sejtlízist követően extrakcióval távolítják el a felesleges makromolekulákat, majd a nukleinsavakat kicsapják, centrifugálják, mossák, és szárítás után vizes oldatban oldják [29]. A folyamat sok időt és figyelmet igényel, de kellő pontossággal tiszta nukleinsavakat kaphatunk.

Léteznek újabb módszerek, amelyen a nukleinsavak egy másfajta tulajdonságát használják ki. Ezek lényege, hogy kaotróp ionokat tartalmazó sók jelenlétében a nukleinsavak erősen kötődnek az üveg felületéhez [28], [29]. Ha a lízis során ilyen sókat használnak, akkor a nukleinsavakat specifikusan ki lehet kötni szilikagyöngyökre vagy szilikamembránra. A kémhatás és ionerősség változtatásával befolyásolhatjuk, hogy inkább RNS, vagy inkább DNS kötődjön. A gyöngyökről/membránról ezután mosással, majd eluációval nagyon tiszta nukleinsavakat nyerhetünk. Ezen módszerek előnye, hogy sokkal gyorsabban, egyszerűbben elvégezhetőek, mint a hagyományos módszerek. Nagyon sok cég fejlettségi ki erre a módszerre előre összeállított vegyszercsomagokat, úgynevezett kit-eket, amely tartalmazzák az izoláláshoz a legtöbb hozzávalót (előre töltött oszlopokat is, melyeken a nukleinsav-kötés megvalósul) [30].

2.2.2. RNS izolálás

Nagyon sokféle RNáz létezik a sejtekben, és vannak közöttük rendkívül stabil enzimek is. RNázokat szinte mindenhol előfordulnak a környezetünkben, akár a bőrünkön, hajunkról is bevihetjük őket [29]. RNS-izolálásnál tehát elsődleges szempont, hogy megakadályozzuk azt, hogy RNázok bekerülhessenek a mintánkba. Ennek megakadályozása érdekében sok labor használ speciális műanyag eszközöket, kesztyűket és egyéb megoldásokat, amely RNáz mentes környezetet képes biztosítani [28]. A tiszta környezet mellett fontos, hogy az izolálást gyorsan és lehetőleg alacsony hőmérsékleten végezzük el [29]. Az FFPE mintákból történő RNS izolálás egyes lépéseit részletesebben a 3.1.2 részben fejtem ki.

2.3. Sejtvonalak szerepe

A humán rákos sejtvonalak a legszélesebb körben használt *in vitro* sejtmodellek a rák biológiájának tanulmányozására és a kísérleti szerek tumorellenes hatásának vizsgálatára [31]. Fontos tudni néhány információt a sejtvonal eredetéről, mint például a beteg neme, etnikuma és életkora, a rák kórszövettani típusa és legalább a 3 legfontosabb receptor állapotát: ER (estrogen - ösztrogén), PR (progesterone - progeszteron) and HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 - human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa) [12]. Ezek a paraméterek azért fontosak, mert különféle eredetű emlőrák sejtvonalak egészen eltérően reagálhatnak azo-

nos kezelés esetén. Minél többet tudunk a rákos sejtek működéséről, annál könnyebben tudunk személyre szabott terápiákat ajánlani a betegeknek [18]. Mindezek miatt a biomarkerek sejtes modellrendszerekben történő vizsgálata segíthet a betegek hatékonyabb kezelésében, és hozzájárul az emlőrák molekuláris funkcióinak jobb megértéséhez.

2.4. Genetikai faktorok

A genetikai faktorok kutatásainak célja a sejtekben végbemenő egyes folyamatok kimutatása. A kutatásunk során hét olyan gént vizsgáltunk meg, amelyek potenciálisan előre jelezhetik a rák várható progresszióját vagy a terápia iránti fogékonyságát, kombinálva más prognosztikai és prediktív tényezőkkel, mint például az életkor, a nem, a daganat elhelyezkedése, mérete, stb. [32] [33]. A gének a kutatócsoport korábbi kutatási és irodalmi adatok alapján kerültek kiválasztásra. Munkám során azokat a géneket kerestem, amelyek expressziói szignifikáns korrelációt mutatnak a betegek teljes túlélési idejével, illetve az áttétek kialakulásával. Az alábbiakban a vizsgált géneket mutatom be a Uniprot adatbázist felhasználva:

- ACOT13 (Acyl-coenzyme A thioesterase 13): Az ACOT13 az acyl-CoAs, a szabadgyökekkel rendelkező zsírsavak és a CoASH (coenzyme A) intracelluláris mennyiségének szabályozásában játszik szerepet.
- CLP1 (Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1): A CLP1 a DNS, RNS és ezen molekulák hibridjeinek foszforilációjában kulcsfontosságú.
- ELOVL5 (Elongation of very long chain fatty acids protein 5): Az ELOVL5 a membrán lipidek és membrán prekursorok előállításának folyamatában játszhat kulcsfontosságú szerepet (bár ezen tulajdonsága még nem tökéletesen bizonyított).
- GJA1 (Gap junction alpha-1 protein): A GJA1 gén, mint ahogyan a nevében is szerepel a gap junction-ok működésében játszik szerepet.
- IL6ST (Interleukin-6 receptor subunit beta): Az IL6ST génnek különböző jelátvitelben van fontos szerepe. Közvetíti az immunválaszt, a vérképzést, a fájdalomcsillapítást és a csont-anyagcserét szabályozó jeleket. Illetve fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben is.
- TNPO3 (Transportin-3): A TNPO3 gén szabályozza többek között a szerin és arginin tartalmú fehérjék sejtmagi transzportját.
- TXNRD1 (Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic): A TXRD1 a tubulin polimerizáció folyamatában és a sejthalál szabályozásában játszik szerepet.

Az ELOVL5 gén magas expressziója a szakirodalom alapján általában jobb prognózissal társul [34]–[36]. A GJA1 gén esetén a szakirodalmi adatok megoszlának, kutatások alapján különböző molekuláris szubtípusú emlőrákos betegségekben viselkedhetnek tumorsuppresszorként és onkogénként is [37], [38]. Az IL6ST gén expresszióját évek óta vizsgálják tumorokban, több kutatás támasztja alá, hogy tumorsuppresszorként funkcionál [39]–[41]. A TXNRD1 gén magas expressziója általában rosszabb prognózissal társul a szakirodalom alapján [42]–[44].

2.4.1. Háztartási gének

A háztartási génekről is fontos említést tenni, az irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy ezek a gének minden sejtben hasonló mennyiségben találhatók meg. Így teljesen függetlennek tekinthetők a tumor progressziójától, ezáltal felhasználhatók más gén-expressziók mennyiségének normalizálására. A kutatás során két háztartási gén expresszióját vizsgáltuk, a Beta-2-Microglobulin (B2M) és a Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) géneket.

2.5. Célkitűzések

Összességében elmondható, hogy az emlőrák biomarkereinek kutatása jelentős mértékben hozzájárulhat a betegek túlélési kilátásainak és terápiás válaszának korai diagnosztizhatóságához, ezen keresztül elősegítve a kezelések hatékony megválasztását. Ennek megfelelően a kutatásunk során potenciális prediktív és prognosztikus faktorok génexpresszóit vizsgáltuk a betegek teljes túlélési idejének és metasztázis meglétének függvényében. Az eredményeinket humán rákos sejtvonalakon végzett gyógyszerérzékenység és génexpresszió vizsgálattal vetjük össze, megvizsgálva a klinikai mintákon kapott eredményeket megerősítik-e a sejteken mért adatok. Ezzel azt is vizsgálva, hogy a sejtes modellek ezen gének tekintetében is megfelelően tükrözik a betegség viselkedését.

3. Alkalmazott módszerek

Ebben a fejezetben szeretném bemutatni a témához alkalmazott eljárásokat és technológiákat, amelyek szerves részét képezték a kutatási folyamatnak. Elsőként az FFPE minákon végzett eljárásokat mutatom be, majd a sejtvonalakon elvégzett módszereket.

3.1. FFPE mintákon végzett eljárások bemutatása

3.1.1. Beteganyag

A feladatomhoz 188 beteg szövetmintája állt a rendelkezésemre, amelyek összesen 750 tárgylemezen lévő metszetet jelentettek, ugyanis általában négy darab immunlemezre húzott natív metszet tartozott egyes esetekhez. A vizsgálatba bevont betegek legfontosabb klinikai jellemzőit a 3.1 táblázat mutatja be. A mintagyűjtés két különböző egészségügyi intézményből történt 1999 és 2010 között. A további eljárásokhoz a betegeket két féle módon csoportosítottam. Az első a "jó prognózisú" versus "rossz prognózisú" betegcsoportosítás, ekkor a teljes túlélés szerint csoportosítottam a betegeket. A "rossz prognózisú" csoportba tartoznak azok a betegek, akiknek túlélési ideje alacsonyabb volt, mint 5 év. Ezzel szemben, a "jó prognózisú" csoportba soroltuk azokat a betegeket, akiknek túlélési ideje meghaladta az 5 éves határt. A második csoportosítás metasztázis kialakulása alapján állt össze, "metasztázis-mentes" versus "metasztázisos" betegek.

Paraméter	Megfigyelések száma/Átlag $\pm$ szórás
Életkor	59.06 $\pm$ 12.73
Grade	
– Grade 1	12 (10.26%)
– Grade 2	56 (47.86%)
– Grade 3	49 (41.88%)
Stage T — daganat mérete	
– T1	17 (14.53%)
– T2	100 (85.47%)
Stage N — nyirokcsomó állapota	
– N0	54 (46.15%)
– N1	54 (46.15%)
– N2	8 (6.84%)
– N3	1 (0.85%)
Stage M — metasztázis állapota	
– M0	90 (76.92%)
– M1	27 (23.08%)
AJCC osztályozás	
– Stage I	47 (40.17%)
– Stage II	2 (1.70%)
– Stage III	41 (35.04%)
– Stage IV	27 (23.08%)

3.1. táblázat. A betegek fontosabb klinikai jellemzői (n=117)

3.1.2. RNS izolálás FFPE mintákból

A minták információtartalmának kinyerése érdekében az első folyamat a **minták előkészítése** volt az izoláláshoz. Először is a minták rendszerezését és sorbaállítását kellett elvégeznünk, ezután kezdhettem el a minták deparaffinálását. A feladat elvégzésekor próbáltam ügyelni arra is, hogy a szövet tulajdonságait leírjam, főleg, ha az nagyon eltért az átlagostól. Ilyenek paraméterek voltak például a szín, az állag és a mennyiség. A deparaffinálás abból áll, hogy az összetartozó négy mintát egyszerre először xilolban áztatjuk körülbelül 2 percig, ezután áttesszük egy másik küvetába, ahol ismét xilolban hagyjuk kb. 2 percig. Ezt követően etanolba helyezzük és ugyanúgy kb. 2 percig benne hagyjuk, majd a kivétel után addig várunk, amíg a minták kifehérednek (kb. 5-10 perc). Amikor ez megtörténik, vagyis amikor az etanol elpárolgott az FFPE mintákról áttesszük 3%-os glicerinbe, és ebben is állni hagyjuk néhány percig. Ennek célja a minták hidratálása, annak megakadályozása, hogy a minta a kiszáradás hatására peregjen. Innen egyesével vesszük ki a 4 mintát, mindegyiket szárítjuk egy kicsit, de nem annyira, hogy kiszáradjon, ugyanis akkor szétötredeznének a szövetek és mindenhova "szállnának". Amikor a minta már nem túl nedves, egy szikével lekaparjuk a tárgylemezről és egy előre kikészített és feliratozott eppendorf-csőbe töltjük. Az összetartozó mintákat ugyanoda kaparjuk, amikor végeztünk az összetartozó 4 metszettel, bezárjuk, és félrerakjuk a későbbi folyamatokhoz.

Az FFPE minták deparaffinálása, és eppendorf-csőbe kaparása után kezdhethetjük el a mintákból az **RNS izolálását**. Ezt nagyon tiszta körülmények között kell elvégezni, mivel a minták könnyen szennyeződhetnek. A mintákat elsősorban a ribonukleázoktól fontos védeni, ugyanis ezek teljesen tökretehetik az RNS-t, így az eredményeket is. Sokféle ribonukleáz létezik, ezeket akár a bőrünkről is bevihetjük a vizsgálni kívánt mintákhoz. Ennek megakadályozásának érdekében steril fülkében kell dolgozni, illetve a fertőtlenítő folyadék mellett érdemes használni olyan folyadékot, amely a ribonukleázoktól tisztítja meg a kezünket és a munkaközegünket (RNaseZAP, ThermoFisher). Manapság izolálásokhoz leggyakrabban előre összeállított úgynevezett kit-eket szoktak alkalmazni. Ezek előnye, hogy tartalmazzák a legtöbb anyagot, amely szükséges a folyamathoz, de mindegyiknek megvan a saját protokollja, amit követni kell. A kit leírását követve két lépésben emésztettük a minták fehérje tartalmát ezáltal feltárva, kicsomagolva a nukleinsavakat. Ezt követően egy elválasztó oszlophoz kötöttük a mintában található nukleinsavakat, melyek közül a DNS molekulákat DNáz emésztés segítségével eltávolítottuk. Végül a mintákból a többszörös mosási és centrifugálási lépések során eltávolítottuk a fehérjéket és az egyéb anyagokat, majd a végső fázisban eluáltuk az oszlophoz kötött RNS-t.

Az izolálás végén a tiszta izolátumokat megvizsgáltuk NanoDrop spektrofotométer és Qubit fluorométer segítségével is. Erre a későbbi NanoString nCounter vizsgálat miatt volt szükség, ugyanis elő kellett szűrünk azokat a mintákat, amelyek kellő mennyiségű és tisztaságú RNS-t tartalmaznak. A vizsgált FFPE minták két különböző egészségügyi intézményből származtak, és bár a készítésükre vonatkozó eljárás eljárás világszerte használt, a gyakorlati protokoll laboronként is eltérhet. Emiatt ellenőriztem azt, hogy van-e számottevő különbség a két intézményből származó minták minősége között RNS mennyiséget, tisztaságot tekintve.

3.1.3. RNS mennyiség és minőség ellenőrzésére alkalmazott eljárások

Az ultraibolya (UV - ultraviolet) abszorbancia vizsgálattal mérhetjük az RNS koncentrációját, tisztaságát. Az ezen elven működő rendszereket spektrofotométereknek nevezzük. A mérés során mi a **NanoDrop spektrofotométert** használtuk. A mérés elve, hogy a vizsgált anyagot fényel megvilágítjuk, majd adott hullámhosszokon meghatározzuk az el nem nyelődött fény arányát. Az RNS-re jellemző, specifikus fényelnyelés, 230 nm és 320 nm között jelentős (ez az UV tartomány), 260 nm-en van abszorpciós maximuma [45]. Természetesen nem csak az RNS-nek, hanem a potenciális szennyezőanyagoknak is van jellemző elnyelési spektruma, maximuma. Így a különféle hullámhosszokon való elnyelés lehetőséget ad arra, hogy az RNS tisztaságát jellemezzük. Az RNS koncentrációját a fényelnyelés mértékéből számolja a készülék. RNS minőségének vizsgálatára a NanoDrop két paramétert használ: 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia aránya (260/280), illetve 260 nm-en és 230 nm-en mért abszorbancia aránya (260/230). A 260 és 280 nm-en mért abszorbancia arányt használjuk a DNS és az RNS tisztaságának értékelésére. RNS esetében a 2,0 körüli arányt tartják „tisztának”. A 260/230 arány a nukleinsav tisztaságának másodlagos mértéke, a „tisztaság” nukleinsav 260/230-as értéke gyakran magasabb, mint a megfelelő 260/280-as érték, és általában az 1,8-2,2 tartományba esik.

A **Qubit**, a NanoDrop-hoz hasonlóan alkalmas a mintában található RNS mennyiség megállapítására. Azonban a Qubit fluorométer, tehát az RNS-hez fluoreszcens molekulát kötünk, így nem az abszorpciót, hanem az emissziót mérjük vele. A tapasztalat pedig azt mutatja, hogy a Qubit egy lényegesen megbízhatóbb és pontosabb eszköz, mint a NanoDrop. Az eljárás nagy előnye a NanoDrop-hoz képest, hogy itt specifikus elnyelési és emissziós spektrumokat mérünk, míg a NanoDrop esetében például mért 260nm-es elnyelési spektrum több (akár szennyező) molekulára is jellemző lehet. A Qubit kalibrálását minden mérési alkalommal el kell végezni, ehhez a gyártó biztosít előre meghatározott koncentrációjú oldatokból álló standard sort. A Qubit mérés lényege az volt, hogy a két eszközből kapott mérési eredmények alapján ki tudjuk válogatni azokat a mintákat, amelyekben elegendő mennyiségű és tisztaságú RNS volt a NanoString vizsgálatához.

Az RNS izolálást követően megvizsgáltuk a minták RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop spektrofotométer és Qubit fluorométer segítségével, a kapott eredmények alapján pedig kiválogattuk a NanoString nCounter vizsgálatához megfelelő izolátumokat. A vizsgálatokhoz felhasznált RNS minták paramétereinek bizonyos tartományon belül kellett lenniük, hogy a későbbi vizsgálatok során ne vizsgáljunk feleslegesen olyan mintát, amelyben nincs kellő mennyiségű vagy minőségű RNS.

3.1.4. NanoString nCounter rendszer

A NanoString rendszer génexpresszió vizsgálatára alkalmazható eljárás. A klasszikus, génexpressziót vizsgáló eljárások reverz transzkripción és qPCR-en alapulnak, ezen eljárások lényege a vizsgálható minták mennyiségének növelése és vizsgálata. Azonban ezek az eljárások sok időt és bonyolult lépéseket igényelhetnek, illetve a mérések nem feltétlenül reprodukálhatók, mivel nem a valós RNS mennyiségét mérjük, hanem egy felszaporított cDNS mennyiséget.

A NanoString nCounter rendszer ezzel szemben az RNS-ek hibridizálásán alapul. Az eljárás során a "capture probe" hibridizál a célpont RNS-sel, míg a "reporter probe" biztosítja a

fluoreszcens mintázatot, aminek segítségével az RNS darab felismerhető. Az ezután felületfixált komplexeket pedig egy automatizált fluoreszcens rendszer detektálja és kvantifikálja [46]. Így ez az eljárás nem igényeli a viszonylag hosszú PCR lépést, valamint az információt közvetlenül az eredeti RNS-ekből szerezzük, így reprodukálhatóbb a mérés [47]. A kutatócsoport régebbi vizsgálataira és irodalmi adatokra alapozva állt össze a target-gének listája, amely a 3.2 táblázatban tekinthető meg.

Gén ID	Gén név	UniProt ID	NCBI ID	Pozíció
ACOT13	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	Q9NPJ3	NM_018473.4	371-470
CLP1	Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1	Q92989	NM_006831.3	1089-1188
ELOVL5	Elongation of very long chain fatty acids protein 5	Q9NYP7	NM_001242828.2	33-132
GJA1	Gap junction alpha-1 protein	P17302	NM_000165.5	659-758
IL6ST	Interleukin-6 receptor subunit beta	P40189	NM_002184.4	2534-2633
TNPO3	Transportin-3	Q9Y5L0	NM_012470.4	2205-2304
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	Q16881	NM_001093771.3	1012-1111
B2M	Beta-2-Microglobulin	P61769	NM_004048.4	206-305
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	P04406	NM_001256799.3	366-465

3.2. táblázat. Kutatásban részt vevő gének és vizsgált szakaszai

3.1.5. NanoString nCounter mérések kiértékelésének módszerei

A NanoString mérésből származó eredmények feldolgozásához R programozási nyelvet használtunk. Ez az egyik legalkalmasabb módja az adatok feldolgozásának az előre megírt programcsomagok segítségével. Azonban ezek ellenére is be kellett vonnunk egy szakértőt, aki segített megtanítani használatát.

A mért adatok kiértékeléséhez elsőként a **minőségellenőrzés** (Quality Control - QC) mérőszámok segítségével - amelyeket a NanoString mérésből származó RCC fájlok tartalmaztak - készítettünk egy előszűrést. Először a NanoString mérés általános teljesítményét vizsgáltuk a kötési és képi sűrűség ellenőrzésével (Binding and Imaging Density). Ezután vizsgáltuk a képsűrűség mértéket, amelynek nagyobbnak kellett lennie egy felhasználó által meghatározott állandónál (esetünkben 0,75), hogy megfelelő legyen a további vizsgálatokhoz. Ezt követően a pozitív kontrollokat a pozitív kontroll linearitás (Positive Control Linearity) és a kimutatási határ (Limit of Detection) paraméterek segítségével értékeltük. Az általános minőségellenőrzéseket követően a két háztartási gént is meg kellett vizsgálni, ugyanis csak azokat a háztartási géneket érdemes használni a későbbi normalizálás során, melyek kellően stabilak és megfelelőek ehhez.

A **normalizálást** két módszerrel végeztük el párhuzamosan, majd a megbízhatóbbat kiválasztva végeztük el a további lépéseket. A **hagyományos normalizálási** lépés háttérkorrekcióból és pozitív kontroll, valamint háztartási génalapú normalizálásból áll. A háttérkorrekció a küszöbértéket vagy a becsült háttérzaj kivonását jelenti [48]. Ez azért fontos a normalizáláshoz, mert a normalizálás után már lehetetlen sokféle nem-fehér zaj eltávolítása. Ezt a lépést követően a normalizálást az előre meghatározott pozitív kontrollok és háztartási gének alapján végezzük. Az R kódban ez a NACHO [49] csomag használatával valósult meg. A RUVSeq (Remove Unwanted Variation) neve a nem kívánt variáció eltávolítására utal. A **RUVSeq normalizációs** folyamatot kifejezetten RNS-seq adatok normalizálására tervezték. Egy skálázási lépésen alapul, amely felső kvartilis normalizálást, a nem kívánt tényezők becslését a RUVg függvény segítségével, valamint a nem kívánt eltérések dimenzióinak iteratív eltávolítását normalizálás és visszacsatolás útján [48], [50] alkalmazza.

A **főkomponens analízis** (Principal Component Analysis - PCA) egy egyszerű, de hatékony eszköz a dimenziócsökkentésre sok paraméterter esetén. Az adatokban legnagyobb eloszlású irány mérésén alapul (főkomponens). A gyakorlatban általában több összetevőt gyűjtenek össze, mivel a legtöbb adatstruktúra bonyolultabb, mint egydimenziós. A kalkulált komponensek merőlegesek egymásra. A **fővariánciakomponens analízis** (Principal Variance Component Analysis - PVCA) egy elsődleges PCA-lépésen és egy másodlagos variánciakomponens-elemzésen (Variance Component Analysis - VCA) alapul. Ennek az elemzésnek az a célja, hogy információt gyűjtsön a paraméterek szórásának arányáról a főkomponensekhez. Ezzel megmutatható, hogy egy adott metrika eredménye szisztematikus komponensvariáncián (például az egyedi azonosítószámok eltérésén) vagy értelmes paramétereken alapul.

A **differenciális expressziós analízis** célja a génexpressziós szintek szignifikáns mennyiségi változásainak feltárása a különböző kísérleti csoportok között — mint esetünkben a jó és a rossz prognózis, metasztázis megléte — a normalizált expressziós adatok alapján statisztikai elemzéssel. Ehhez a DESeq2 módszert használtuk, amely elosztja a count-okat a génszámok medián arányával a génenkénti geometriai átlaghoz viszonyítva [51].

3.2. Sejtes vizsgálatok

A betegekből származó FFPE mintákon elvégzett vizsgálatok alapján kapott eredményeket sejtes modellrendszerben mért eredményekkel is szeretnénk volna alátámasztani. Ehhez hét különböző sejtvonalat használtunk, amelyeken vizsgáltuk a doxorubicinérzékenységet az FFPE mintákon vizsgált gének expresszióinak függvényében.

3.2.1. Sejtvonalak

Munkám során hét különböző sejtvonallal dolgoztam, amelyeken nem csak méréseket végeztem, hanem arról is gondoskodnom kellett, hogy életben maradjanak. A sejtvonalakat T25-ös sejttenyésztő flakákban tartottuk, és néhány naponta ellenőriznem kellett őket. Ha túl sok sejt volt a flakában, át kellett őket passzálni, vagy ha a táptalaj elszíneződött, friss táptalajra kellett cserélni a régit. A 3.3 táblázatban látható egy összefoglalás az általunk vizsgált sejtvonalakról.

Sejtvonal	Betegség	Életkor	Etnikum	HER2	ER	Pr	Depositor
BT-594	ductal carcinoma	72	Kaukázusi	-	-	-	W Coutinho, EY Lasfargues
Hs578T	carcinoma	74	Kaukázusi	-	-	-	AJ Hackett
MDA-MB-157	medullary carcinoma	44	Afro-amerikai	-	-	-	R Cailleau
MDA-MB-231	adenocarcinoma	51	Kaukázusi	-	-	-	R Cailleau
MDA-MB-468	adenocarcinoma	51	Afro-amerikai	-	-	-	R Cailleau
SK-BR-3	adenocarcinoma	43	Kaukázusi	+	-	-	G Trempe, LJ Old
ZR-75-1	ductal carcinoma	63	Kaukázusi	-	+	+/-	LW Engel

3.3. táblázat. Vizsgált sejtvonalak általános adatai

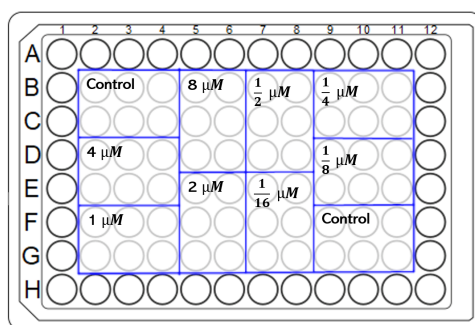
Az ATTC honlapján elérhető és megrendelhető az összes sejtvonal: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/>

3.2.2. SRB assay

Az SRB (sulforhodamine B - szulforodamin B) vizsgálatot 1990-ben Skehan és munkatársai fejlesztették ki sejtproliferáció vizsgálatra [52]. Az SRB egy fluoreszcens festék, amelynek számos különböző felhasználási területe van, például sejtsűrűség meghatározására használható sejttenyészetben lévő sejtfehérjék mennyiségének meghatározásával [53]. Az SRB protokoll négy fő lépésre osztható: sejtvonalak plételezése, sejtek inkubációja a hozzáadott kezeléssel, sejtek fixálása és festése SRB-vel, valamint abszorbancia méréssel történő kiértékelés [54].

A **sejtvonalak plételezésénél** az egyik legfontosabb, hogy a plate összes "lyukába" (well) ugyanannyi sejtet pipettázzunk, esetünkben 5000 sejt/well 200 μ l tápközegben. Ehhez először át kellett passzálni a sejteket és egy Falcon-csőbe gyűjteni (szükség esetén táptalajt is adni hozzá). Ezután meg kell számolni a sejteket például egy automatikus cellaszámláló rendszerrel. Majd a megfelelő számítások után ki kellett osztani a "tisztá" táptalajt és a sejtes táptalajt a megfelelő arányban. Ezt követően egy inkubálási idő következik (egy nap), amikor a sejtek a wellek aljához tapadnak.

A sejtek **kezelése** előtt ki kellett számítanunk a kiválasztott kezelés megfelelő koncentrációit, és ilyen koncentrációjú táptalajokat kellett előkészítenünk (általában hígítási sor készítenünk). Ezt követően a kezelőanyag különböző koncentrációival a táptalaj eltávolítása után tudjuk kezelni a sejteket. A kezelés után 72 órás inkubálási idő következik, miközben a sejtek a kezelés hatására másképp növekedhetnek a különböző wellekben. A kezeléshez doxorubicint használtunk amely egy antraciklin típusú antibiotikum, amelyet különféle rákos megbetegedések és Kaposi-szarkóma kezelésére használnak. Az SRB vizsgálatához 8 különböző koncentrációban vizsgáltuk a doxorubicin hatását a sejtekre: 8, 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 és 1/16 μ M. Platenként 6-6 ismétlés volt kezelésekből és 12 lyukat normál táptalajjal töltöttem fel (ezek voltak a kontrollok). A kiosztás a 3.1 ábrán látható. A plate széle körben PBS-sel (foszfáttal pufferelt sóoldat) volt megtöltve, a párolgás gátlása érdekében. Az életképességi vizsgálatot minden sejtvonalon elvégeztem, ugyanakkor azért, hogy következtetéseinket kellően nagy számú párhuzamos mérésen alapuló, megbízható eredményekből vonhassuk le, a bemutatott átlag értékek nem csak saját méréseken alapulnak.



3.1. ábra. A különböző doxorubicin koncentrációk elosztása a 96 lyukú platen.

A sejtek **fixálásához** 10%-os TCA-t (trichloroacetic acid - triklór-ecetsav) kell hozzáadni és várni 1 órát, míg a sejtek fehérje tartalma a wellek aljára rögzülnek. Ezt követően legalább 5-ször le kellett mosni a platet (mert a TCA elronthatja a mérés eredményét), amit egy szárítási időszak követ. A platek kiszáradása után következik a **festés**, ennek során 15 percig festjük a sejteket

0,4 w/v% SRB-vel, míg elszíneződnek, majd a platet 1% ecetsavval mossuk. Ez a folyamat azért fontos, mert minden wellbe sok SRB-t adunk, ami megfesti a sejteken lévő fehérjéket, de utána nem akarjuk, hogy a fehérjékhez nem kötő SRB a lyukakban maradjon. Ezután ismét meg kell várunk, amíg a plate megszárad.

3.2.3. SRB mérések kiértékelésének folyamata

A kiértékeléshez az első lépés a csapadék feloldása 10 nM Tris [tris(hydroxy- methyl) aminomethane - trisz(hidroxi-metil)aminometán] puffer hozzáadásával. Ezen a ponton nagyon óvatossá kell lennünk, hogy minden wellbe pontosan ugyanannyi puffert adjunk a fotometrikus mérés miatt. Ezt követően rázógépre kell tenni a platet, amíg a csapadék fel nem oldódik. Amint teljesen feloldódott, 570 nm-en mérjük a feloldódott fehérjék fényelnyelését.

Az eredmények kiértékelése során fontos volt blank méréseket készíteni, hogy a különböző időpontokból származó mérések összehasonlíthatóak legyenek egymással. Ennek segítségével egyszerűen ki lehetett számolni a normalizált értékeket. Az így kiszámolt eredményeket logaritmikus skálán ábrázoltam, majd egy szigmoid görbét illesztettem a számított adatokra. Fontos kiemelni, hogy egy sejtvonalhoz tartozó eredmény minimum 5 párhuzamos mérés átlagolt eredménye, és minden mérés során 6-6 wellre osztottuk a különböző koncentrációjú kezelő tápoldatokat. Az illesztett görbe alapján meghatároztam a GI50 értékeket is, ez jelenti azt a doxorubicin koncentrációt, ahol a sejtek relatív életképessége 0.5-re csökkent.

3.2.4. RNS izolálás sejtvonalakból

Az eljárás nagyon hasonlít az FFPE mintákból való RNS izoláláshoz, a nagy különbség, hogy sejtvonalak esetében nincs szükség deparaffinálni a mintákat, ugyanis friss mintákból dolgozhatunk. A sejtvonalakról le kell önteni a tápoldatot a sejtekről, illetve óatosan lemosni PBS-sel a tápoldat maradékát. Ezután az RNS izolálás lépései nagyon hasonlóak, de érdemes olyan kit-et választani, amely kimondottan a mintákhoz van igazítva. Mi az E.Z.N.A.® HP Total RNA Kit segítségével végeztük el az RNS izolálását a sejtvonalakból.

Az első lépés a lízis, ennek a folyamatnak a lényege a sejtek lizálása. Ezután a mintában lévő nukleinsavakat az elválasztó oszlopra kötjük, majd DNáz-emésztéssel eltávolítjuk a DNS-molekulákat. A harmadik lépésben a fehérjéket és egyéb anyagokat távolítjuk el a mintákból többszöri mosás és centrifugálás során. Végül az RNS-t eluáljuk az oszlopról. Az izolátumokat az FFPE mintákhoz hasonlóan ellenőrizzük NanoDrop spektrofotométerrel.

3.2.5. TaqMan assay

A TaqMan assay RT-qPCR-en (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction - reverz transzkripció polimeráz láncreakció) alapul. A folyamat során az RNS-régióból egy reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t állítunk elő, majd ezt követik a qPCR reakció lépések a kapott cDNS-en [55]. A qPCR folyamat lényege, hogy nemcsak a teljes folyamat végén méri az RNS mennyiségét, hanem minden ciklus végén is. Ezért ez a módszer alkalmas a kiindulási RNS mennyiségének meghatározására, ezáltal alkalmas lehet génexpresszió vizsgálatára [35].

A TaqMan assay-hez először primereket kellett terveznem, amikhez a NanoString mérések adatait használtam fel. A NanoString az egyes gének expressziós mintázatát csak egy bizonyos szekvencia régióra támaszkodva azonosítja, ezért ezekhez a szekvenciákhoz terveztem a primereket, amiket az AllelID6 és BioEdit segítségével ellenőriztem. A 3.2 táblázatban tekinthetők meg a vizsgált génekhez tartozó pozíciók.

4. Eredmények és értékelésük

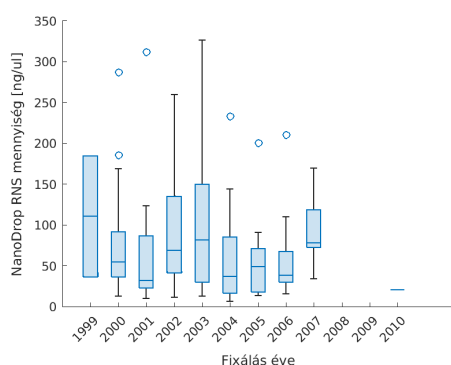
Ebben a fejezetben szeretném bemutatni és értékelni a betegmintákon mért, valamint a sejtvonalak vizsgálata során kapott eredményeket.

4.1. FFPE minták eredményei

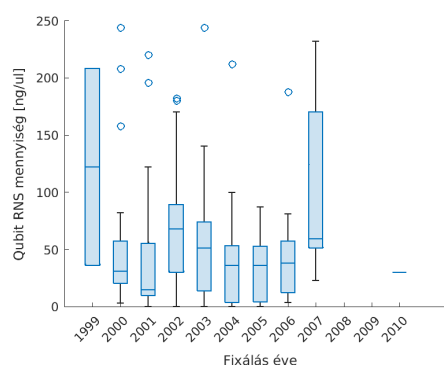
Az alábbi részben szeretnék beszámolni az FFPE mintákon végrehajtott mérések eredményeiről. A célunk olyan gének meghatározása volt, amelyek kapcsolatban állnak a betegek teljes túlélési ideivel és/vagy metasztázis kialakulásával.

4.1.1. RNS izolálás kiértékelése

Az 4.1 ábrán az RNS mennyiségének eloszlását ábrázoltam a minta fixálásának idejének függvényében. Látható, hogy az adott évben fixált minták között minden esetben volt kevés és több RNS-t adó minta is, vagyis a régebbi mintákból is találtunk jobbkat és rosszabbakat, ugyanúgy, mint a később készített mintákból. Továbbá megfigyelhető, hogy a kinyert RNS koncentráció sok esetben jelentős szórás mutatkozott. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a fixálás óta eltelt idő és az izolált RNS mennyisége között nincs egyértelmű összefüggés.



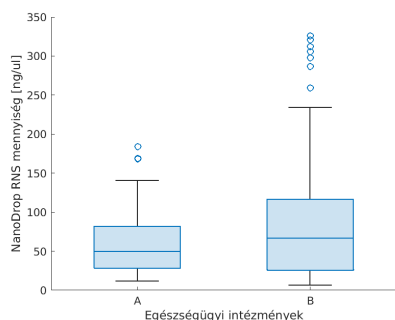
(a) NanoDrop spektrofotométerrel vizsgálva



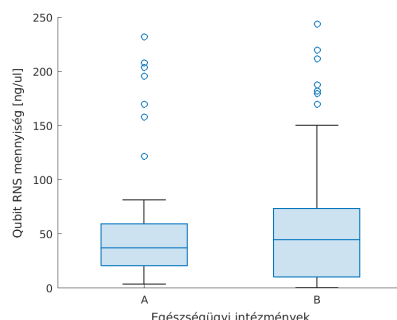
(b) Qubit fluorométerrel vizsgálva

4.1. ábra. A mért RNS mennyiségek a fixálás évének függvényében a különböző eszközökkel (n=188). (Vastag vonal: medián; box: interkvartilis tartomány; szélső szórásmutató: min-max; kiugró érték: 25 ill. 75 % + 1,5 interkvartilis tartomány)

A 4.2 ábrán a két egészségügyi intézményből származó minták összehasonlítása látható a kinyert RNS tekintetében. A kinyert RNS mennyisége a "B" egészségügyi intézmény esetén nagyobb szórást mutatott, de azt fontos kiemelni, hogy innen közel 2,5-szer annyi minta származott, mint az "A" egészségügyi intézményből. Illetve fontos még megvizsgálni az átlagokat, ezek viszonylag közel állnak egymáshoz, a "B" intézmény esetén kissé magasabb.



(a) NanoDrop spektrofotométerrel vizsgálva



(b) Qubit fluorométerrel vizsgálva

4.2. ábra. Alábrák bal oldalán: Az "A" egészségügyi intézményből származó mért RNS mennyiségének szórása ($n=54$); Alábrák jobb oldalán: A "B" egészségügyi intézményből származó mért RNS mennyiségének szórása ($n=134$). (Vastag vonal: medián; box: interkvartilis tartomány; szélső szórásmutató: min-max; kiugró érték: 25 ill. 75 % + 1,5 interkvartilis tartomány)

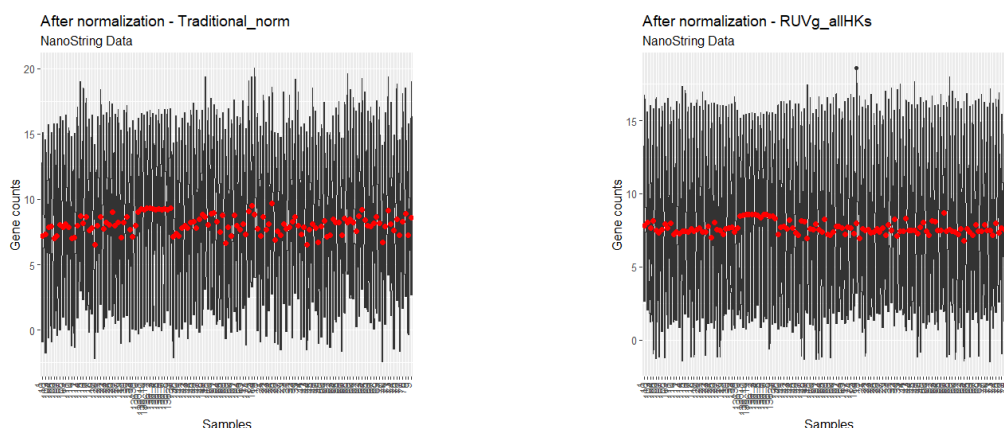
Összességében megállapítható, hogy az RNS expressziókban számottevő eltérést nem tapasztalunk az év és az intézmények eltérése esetén sem. Ez alapján a NanoDrop és Qubit által megfelelőnek tekinthető betegmintákat használtuk a későbbi vizsgálatokhoz ($n=117$).

4.1.2. NanoString nCounter mérések kiértékelése

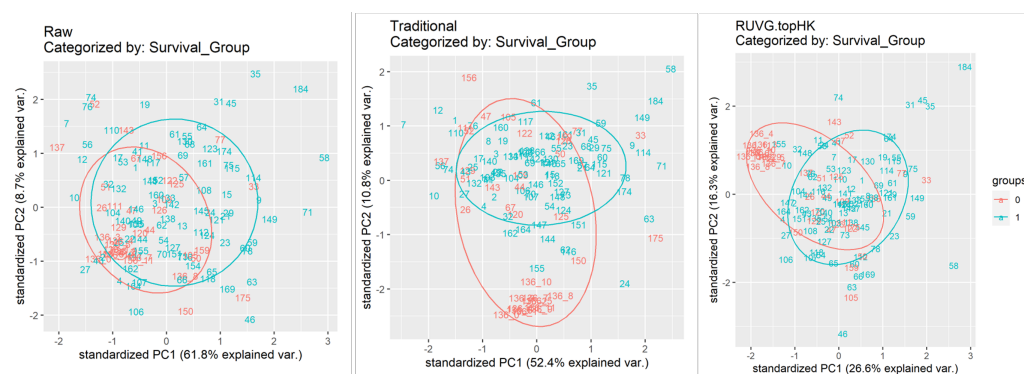
A NanoString nCounter eredmények kiértékeléséhez először is rendezni kellett az adatainkat a betegekről. Ezt követően felállítottunk két betegcsoportot, az úgynevezett "jó prognózisú" és "rossz prognózisú" csoportokat, a "rossz prognózisú" csoportba soroljuk, akiknek teljes követési ideje (follow-up time) 5 év alatt van, a "jó prognózisú" csoportba pedig 5 év fölöttiek tartoznak. Ezen kívül egy második csoportosítást is felállítottunk metasztázis alapján (nincs, vagy van).

Ezt követően a NanoString nCounter mérési eredményeken elvégeztünk minőségellenőrzéseket és normalizáltuk. A normalizálás kétféle módon történt. A 4.3 ábra alapján láthatjuk, hogy a RUVSeq módszer robusztusabb eredményeket ad, mint a hagyományos normalizálás. Az ábrán jól látható ezen kívül, hogy sokkal kisebb a szórás (pirossal jelölve) a medián értékek között, és a szórás varianciája is jóval kisebb RUVSeq normalizálás esetén. Ezért a következő lépésekben a RUVSeq normalizálás kimeneteit használtuk.

Az adatfeldolgozás során több PCA-t használtunk a több paraméterrel elválasztható rész-adatkészleteken, mint például életkor, grade, hogy az adott csoportban lévő kategóriák közötti különbségeket vizualizáljuk. Az 4.4 ábra egy példát ábrázol, amely a túlélési idő alapján lett csoportosítva, látható, hogy PCA segítségével meglehetősen jól el tudjuk különíteni a betegeket a két csoportra.



4.3. ábra. A két normalizálási módszer közötti különbségek a normalizálás után. A bal oldalon a hagyományos normalizálás, a jobb oldalon a RUVSeq normalizálás látható.

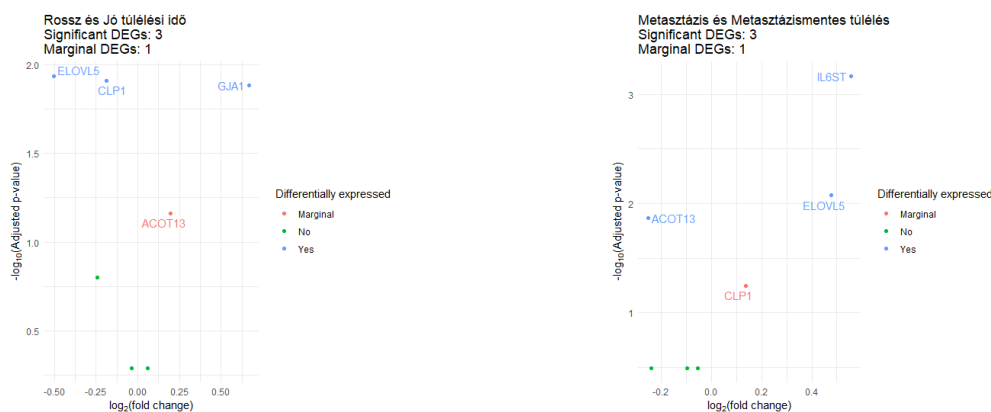


4.4. ábra. A csoportosítás a túlélési idő két kategóriája alapján történt: 5 évnél acsnyabb követési idő esetén a "rossz prognózisú" betegek számított (0-val és pirossal jelölve az ábrán), 5 év feletti követési idő esetén "jó prognózisú" betegek jegyeztük (1-gyel és kékkel jelölve)

Ezt követően a normalizált adatokon differenciál-expresszió analízist (Differential expression analysis - DEA) végeztünk a két csoportra DESeq2 módszer alapján, ezzel megvizsgálva, hogy találunk-e szignifikáns mennyiségi változást a gének expressziójában a két csoport között.

A differenciális expressziós analízis eredményeinek megjelenítéséhez Volcano plotokat használtunk, amelyek az adott statisztikai módszer (esetünkben DESeq2) statisztikai szignifikancia logaritmikus értékét jelenítik meg a nagyságrend változás (fold change) logaritmikus értékének függvényében.

A 4.5 ábrán a DESeq2 módszer alapján statisztikailag szignifikáns gének láthatók a "jó prognózisú" kontra "rossz prognózisú" csoportokra, valamint a metasztázismentes és metasztázisos betegek csoportjaira. Jól látható, hogy van átfedés a szignifikánsnak talált gének között, ami egyben jelzheti ezen gének robusztusságát is. Ez alapján meghatározható, hogy a mérések alapján a jobb prognózisú betegekben az ELOVL5 és CLP1 gének expressziója magasabb, míg a GJA1 és ACOT13 gének expressziója a rossz prognózisú betegekben magasabb. A metasztázis szerinti csoportosítás esetében csak az ACOT13 gén magasabb expressziója társul szignifikánsan azon betegek túlélésével, akikben metasztázis alakul ki, míg az IL6ST, ELOVL5 és a CLP1 gének magasabb expressziója társul gyakrabban a betegek metasztázis mentes túlélésével.



4.5. ábra. A Volcano plot, amelyek a gének statisztikai szignifikanciáját mutatják a DESeq2 módszer alapján. A bal oldali Volcano diagram a "jó" és a "rossz" prognózisú betegek csoportjainak eredményét ábrázolja, a jobb oldali pedig a metastázismentes és metastázisos emlőrákos betegek csoportjait.

4.1.3. Génexpresszió és túlélés közti összefüggések irodalmi adatokkal történő összevetése

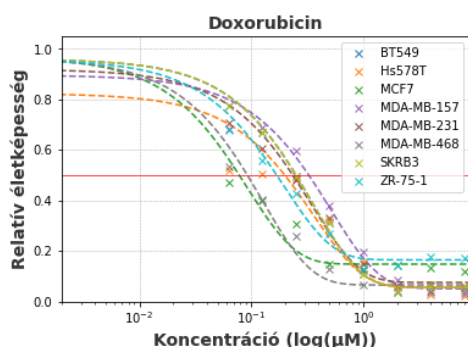
ACOT13 gén emlőrákos betegekben mért génexpresszió vizsgálatára nem találtam kutatást, főként tüdőrákos betegekben szokták vizsgálni. Tüdőrák esetében a magas expressziója általában rossz klinikai eredményekkel társul [56], [57], amely egyezik az általunk talált eredményekkel. **CLP1** gén tumorokban lévő expresszióját vizsgáló korábbi kutatásait nem találtam. Így vizsgálati eredményeink, miszerint a CLP1 alacsony alacsony expressziója rövidebb túléléssel társul új tudományos felismerésnek tekinthető. **ELOVL5** gén esetén több kutatást is találtam, amelynél ugyanúgy, mint ahogy a mi eredményeinkből látható, a jobb prognózisú mellrákos betegekben jár magas expresszációval [34]–[36]. **GJA1** gén esetén egy kutatás azt mutatta be, hogy a mellrák különböző szubtypusaiban jelentősen eltér a gén expresszációja, a lumináris típusoknál a jobb (hosszabb) túléléshez magasabb expressziós szint társul, míg a HER2 pozitív (enriched) esetén ennek ellenkezője, vagyis az alacsony szintje társul jobb prognózishoz [37]. Méreési eredmények azt mutatják, hogy a rosszabb prognózisú betegekben expresszáódik nagyobb mértékben, amely részben egyezik az irodalmi adatokkal. **IL6ST** gén az eredményeink szerint szignifikáns korrelációt mutat a betegek hosszabb túlélésével, a szakirodalomban is nagyon hasonló kutatási eredményeket találtam [41], [58]. **TXNRD1** gén esetén megoszlottak a kutatási eredmények az általam talált cikkekben. Azonban az irodalmi adatok jelentős többsége szerint a TXNRD1 gén túlzott expressziója a mellrák progressziójával társul [42]–[44]. Ugyanakkor egyes szubtypusok esetén ezekkel ellentétes eredményeket is közöltek [44]. Ezzel megfelelően a mi eredményeink alapján sem lehet egyértelműen állást foglalni amellet, hogy a TXNRD1 expressziója ilyen összefüggést mutat a tumor progressziójával.

4.2. Sejtes vizsgálatok eredményei

A sejtvonalakon végzett vizsgálatok célja az FFPE mintákon kapott eredményekkel való összevetés, illetve a génexpressziók és gyógyszerérzékenység közötti kapcsolat keresése volt. Az így kapott eredményeket mutatom be az alábbi részben.

4.2.1. SRB assay eredmények

Az SRB assay során mindegyik sejtvonalból legalább 5 ismétlés készült. A doxorubicin kezelés eltérő koncentrációit a sejtek relatív életképességének függvényében mutatom be a következő ábrán. A 4.6a ábra a különböző sejtvonalak kezelésre való érzékenységét mutatja. Az egyes sejtvonalakhoz tartozó eredmények több mérés átlagát tartalmazzák. A mérésekből meghatározható GI50 értékek a 4.6b táblázatban láthatóak.



Sejtvonalak	GI50
BT549	0,075
Hs578T	0,199
MDA-MB-157	0,326
MDA-MB-231	0,235
MDA-MB-468	0,092
SKBR-3	0,251
ZR-75-1	0,169

(a) Sejtvonalak relatív életképessége doxorubicinnel történő kezelés esetén (b) Sejtvonalak GI50 értéke doxorubicin kezelésre a méréseink alapján

4.6. ábra. Sejtvonalak relatív életképessége és GI50 értéke doxorubicinnel történő kezelés esetén. Az egyes sejtvonalhoz tartozó eredmények átlagos értékek, minimum 5 párhuzamos mérés eredményének átlaga.

4.2.2. RNS izolálás és TaqMan assay eredményei

Az FFPE mintákon kívül, a hét különböző sejtvonalból is izoláltam RNS-t. A 4.7a táblázatban látható a NanoDrop spektrofotométerrel mért eredmények. Az RNS koncentrációk, illetve a két RNS minőségét jelző mutató (260/280, 260/230) alapján az összes mintát felhasználtuk a további TaqMan assay vizsgálatokhoz.

A TaqMan assay során megvizsgáltuk a hét kiválasztott gént, amelyek potenciális biomarkerei lehetnek az emlőráknak: ACOT13, CLP1, ELOVL5, GJA1, IL6ST, TNPO3, TXNRD1. Ezek mellett a háztartási géneket is vizsgáltuk (B2M, GAPDH) a normalizálás, összehasonlíthatóság céljából. Eredményeink alapján a B2M gén bizonyult alkalmasabb háztartási génnek, így további eredményeink bemutatásához a B2M-hez tartozó mérési eredményeket használtuk fel.

ID	Sejtvonal	Koncentráció	A260	A280	260/280	260/230
1	BT-549	120.1	3.002	1.440	2.08	1.52
2	Hs578T	175.6	4.391	2.179	2.02	1.50
3	MDA-MB-157	90.7	2.268	1.114	2.04	2.20
4	MDA-MB-231	1104.3	27.608	13.034	2.12	2.00
5	MDA-MB-468	582.9	14.572	7.108	2.05	2.31
6	SK-BR-3	189.4	4.734	2.357	2.01	2.26
7	ZR-75-1	324.3	8.107	3.956	2.05	2.19

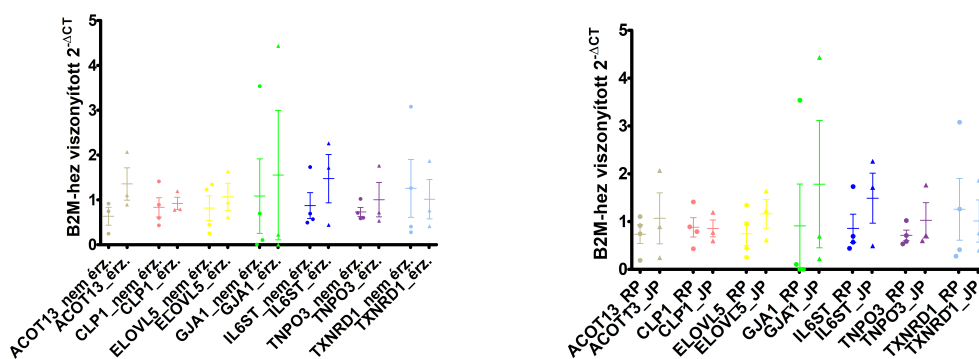
ACOT13	CLP1	ELOVL5	GJA1	IL6ST	TNPO3	TXNRD1	GAPDH
BT549	0.894	0.776	0.6159	4.433	2.260	0.717	1.868
Hs578T	0.188	0.432	1.342	3.537	1.731	0.709	0.276
MDA-MB-157	0.246	0.598	1.229	0.695	0.492	0.600	0.403
MDA-MB-231	0.744	1.411	0.250	0.105	0.569	1.021	1.263
MDA-MB-468	1.104	0.790	0.947	0	0.4417	0.532	0.411
SKBR-3	0.915	0.891	0.444	0.002	0.694	0.586	3.077
ZR-75-1	2.067	1.194	1.639	0.223	1.715	1.763	0.764

(a) Sejtvonalakból izolált RNS mennyiségi és minőségi értékelése NanoDrop spektrofotométerrel vizsgálva. (b) A B2M-hez viszonyított $2^{-\Delta CT}$ értékek

4.7. ábra. A sejtvonalakból származó RNS izolálás és TaqMan assay eredményei

4.3. Kapcsolat a génexpresszió és az életképesség között

A sejtvonalakon mért génexpressziós adatokat összevetettük a sejtvonalak életképességével. Ehhez a sejtvonalakat az általunk mért GI50 értékeik átlagához képest csoportosítottuk "érzékeny" és "nem érzékeny" csoportra. A mediánjuk és az átlaguk hasonló volt, amiatt döntöttünk az átlagnál, hogy ne kelljen kizárnunk sejtvonalat. Ezzel párhuzamosan egy második csoportosítást is bevezettünk, a sejtvonalak molekuláris szubtypusaiból következtethetően az alapján, hogy a sejtvonal kiindulásul szolgáló tumor jó vagy rossz prognózisúnak volt-e feltételezhető, továbbá "RP" és "JP"-ként hivatkozom a két csoportra. A 4.8 ábrán tekinthetők meg az így kapott eredmények. Mindkét számítás során a B2M háztartási génhez viszonyított eredményeket használtam fel.



(a) Vizsgált gének expressziója a doxorubicin (b) Vizsgált gének expressziója a sejtvonalak ki-
 érzékenység függvényében ("érzékeny" és "nem indulású szolgáló tumorok várható progresszi-
 érzékeny" sejtek: a mért GI50 érték átlaga men- ója függvényében ("RP": rossz prognózisú tu-
 tén csoportosítva) morból indított sejtvonal; "JP": jó prognózisú
 tumorból indított sejtvonal

4.8. ábra. A génexpressziók és életképességek közötti kapcsolat, a B2M génhez számítva

A sejtvonalak "érzékeny"- "nem érzékeny" és "RP"- "JP" szerinti csoportosítása alapján az látható, hogy bizonyos gének mutatnak számottevő eltérést. Legnagyobb eltérést az IL6ST gén esetében tapasztalhatunk, ahol a mérések alapján a magasabb expresszió társul a feltételezhetően kisebb malignitáshoz. Ez az eredmény alátámasztja a NanoSting vizsgálat során klinikai minták esetén kapott eredményünket, ahol az átlagosnál hosszabb teljes túlélés társult nagyobb IL6ST expresszióval. Az ELOVL5 gén expressziója esetében is egybecsengő eredményeket kaptunk a beteganyagon és a sejtvonalakon mért eredmények tekintetében. Ugyanakkor, ebben az esetben a sejtvonalakon mért eredmények szórása nagymértékű. Az ACOT13 esetében pedig ellentmondó eredményeket kapunk, a sejtvonalakon végett vizsgálat azt mutatta ki, hogy a magasabb ACOT13 expresszió társul jobb prognózissal, míg az irodalom és a betegmintákon végzett mérés eredménye ennek ellenkezőjére utal. A többi gén esetében a sejtvonalakon mért eredmények szórása nem tette lehetővé robusztus következtetés levonását.

5. Összegzés

Munkám során hét olyan gén expresszióját vizsgáltam, melyek kifejeződése prognosztív és prediktív értékkel bírhatnak. Összesen 188 betegből származó FFPE mintából izoláltam RNS-t, majd az így kapott izolátumok génexpressziós mintázatait NanoString nCounter rendszer segítségével határoztuk meg. A génexpressziós mintázatokból a normalizálást követően differenciál expresszió analízist hajtottam végre, így sikerült elkülönítenem azon géneket, amelyek expressziói szignifikánsan korrelálnak a betegek túlélési idejével vagy a betegek metasztázisos/metasztázis mentes voltával. A mérések során a CLP1 és ELOVL5 gének magasabb expressziós értékei mutattak szignifikáns korrelációt a betegek hosszabb túlélési idejeivel. A GJA1 (és valamelyest az ACOT13) expressziója pedig a rossz prognózisú betegekben mutatkozott magasabbnak: GJA1. Metasztázis mentes túlélés esetén az IL6ST, ELOVL5 (és valamelyest CLP1) gének expresszióit, míg metasztázisos betegeknél az ACOT13 expresszióját találtuk magasabbnak.

A betegekből származó mintákon mért eredményeket összevetettük hét különböző emlőrák sejtvonalon végezett *in vitro* vizsgálat eredményével, azt vizsgálva, hogy a sejtvonalak az egyes gének tekintetében mennyire erősítik meg a betegminták elemzése során tett megállapításainkat. Vagyis az adott gén tekintetében a sejtvonalak mennyire tekinthetők jó kísérleti modellnek. Ennek érdekében megvizsgáltuk a sejtvonalak doxorubicin-érzékenységet SRB assay segítségével. Ezt követően a sejtvonalakból is izoláltam RNS-t, majd a mennyiség és minőségellenőrzést (NanoDrop spektrofotométer) követően TaqMan RT-qPCR mérést végeztünk rajtuk a hét kiválasztott génre. A sejtvonalak között mind doxorubicin-érzékenység, mind génexpresszió tekintetében tapasztalunk eltéréseket, ami lehetőséget adott annak vizsgálatára, hogy az egyes gének expressziója összefüggésbe hozható-e a sejtek doxorubicin érzékenységgel ezáltal megerősítve a klinikai adatokon kapott összefüggéseket.

A sejtvonalakat két féle módon csoportosítva - a doxorubicin kezelésre adott válaszuk alapján "érzékeny"- "nem érzékeny" és a kindulásul szolgáló tumor várható prognózisa alapján "RP"- "JP" (rossz prognózisú – jó prognózisú) - tapasztalunk összefüggést egyes gének expressziója és a sejtvonalak doxorubicinérzékenysége között. Legszembetűnőbben az IL6ST gén esetében, amelynek magasabb expressziója jobb prognózissal társul.

Irodalom

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman és F. Bray, “Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”, *International journal of cancer*, 136. évf., 5. sz., E359–E386., 2015.
- [2] C. E. DeSantis, C. C. Lin, A. B. Mariotto, R. L. Siegel, K. D. Stein, J. L. Kramer, R. Alteri, A. S. Robbins és A. Jemal, “Cancer treatment and survivorship statistics, 2014”, *CA: a cancer journal for clinicians*, 64. évf., 4. sz., 252–271. old., 2014.
- [3] U. Dafni, Z. Tsourti és I. Alatsathianos, “Breast cancer statistics in the European Union: incidence and survival across European countries”, *Breast Care*, 14. évf., 6. sz., 344–353. old., 2019.
- [4] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser és F. Bray, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018”, *European Journal of Cancer*, 103. évf., 356–387. old., 2018.
- [5] C. E. DeSantis, J. Ma, M. M. Gaudet, L. A. Newman, K. D. Miller, A. Goding Sauer, A. Jemal és R. L. Siegel, “Breast cancer statistics, 2019”, *CA: a cancer journal for clinicians*, 69. évf., 6. sz., 438–451. old., 2019.
- [6] D. P. Winchester, R. T. Osteen és H. R. Menck, “The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age”, *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 78. évf., 8. sz., 1838–1843. old., 1996.
- [7] C.-H. Lin, Y.-S. Lu, C.-S. Huang, K.-T. Kuo, C.-C. Wang, S.-L. You, P.-H. Lin, D.-Y. Chang, W.-H. Kuo, K.-J. Chang és tsai, “Prognostic molecular markers in women aged 35 years or younger with breast cancer: is there a difference from the older patients?”, *Journal of clinical pathology*, 64. évf., 9. sz., 781–787. old., 2011.
- [8] I. Godet és D. M. Gilkes, “BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer”, *Integrative cancer science and therapeutics*, 4. évf., 1. sz., 2017.
- [9] S. Sharma, P. K. Patnaik, S. Aronov és R. Kulshreshtha, “ApoptomiRs of breast cancer: basics to clinics”, *Frontiers in Genetics*, 7. évf., 175. old., 2016.
- [10] C. Li, D. Uribe és J. Daling, “Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer”, *British journal of cancer*, 93. évf., 9. sz., 1046–1052. old., 2005.

- [11] G. K. Malhotra, X. Zhao, H. Band és V. Band, “Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers”, *Cancer biology & therapy*, 10. évf., 10. sz., 955–960. old., 2010.
- [12] J. S. Reis-Filho és L. Pusztai, “Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction”, *The Lancet*, 378. évf., 9805. sz., 1812–1823. old., 2011.
- [13] A. G. Waks és E. P. Winer, “Breast cancer treatment: a review”, *Jama*, 321. évf., 3. sz., 288–300. old., 2019.
- [14] L. Chen, L. S. Cook, M.-T. C. Tang, P. L. Porter, D. A. Hill, C. L. Wiggins és C. I. Li, “Body mass index and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple negative breast cancer”, *Breast cancer research and treatment*, 157. évf., 3. sz., 545–554. old., 2016.
- [15] G.-S. Liao, Y.-C. Chou, H.-M. Hsu, M.-S. Dai és J.-C. Yu, “The prognostic value of lymph node status among breast cancer subtypes”, *The American Journal of Surgery*, 209. évf., 4. sz., 717–724. old., 2015.
- [16] M. C. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, M. Watson, S. Davies, P. S. Bernard, J. S. Parker és tsai., “Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer”, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101. évf., 10. sz., 736–750. old., 2009.
- [17] B. Weigelt, F. C. Geyer és J. S. Reis-Filho, “Histological types of breast cancer: how special are they?”, *Molecular oncology*, 4. évf., 3. sz., 192–208. old., 2010.
- [18] M. T. Weigel és M. Dowsett, “Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction”, *Endocrine-related cancer*, 17. évf., 4. sz., R245–R262., 2010.
- [19] X. Dai, L. Xiang, T. Li és Z. Bai, “Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes”, *Journal of Cancer*, 7. évf., 10. sz., 1281. old., 2016.
- [20] D. F. Hayes, C. Isaacs és V. Stearns, “Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis”, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 6. évf., 4. sz., 375–392. old., 2001.
- [21] N. Ludyga, B. Grünwald, O. Azimzadeh, S. Englert, H. Höfler, S. Tapio és M. Aubele, “Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses”, *Virchows Archiv*, 460. évf., 2. sz., 131–140. old., 2012.
- [22] M. Srinivasan, D. Sedmak és S. Jewell, “Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids”, *The American journal of pathology*, 161. évf., 6. sz., 1961–1971. old., 2002.
- [23] S. K. Nam, J. Im, Y. Kwak, N. Han, K. H. Nam, A. N. Seo és H. S. Lee, “Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation”, *Korean journal of pathology*, 48. évf., 1. sz., 36. old., 2014.
- [24] J. Hedegaard, K. Thorsen, M. K. Lund, A.-M. K. Hein, S. J. Hamilton-Dutoit, S. Vang, I. Nordentoft, K. Birkenkamp-Demtröder, M. Kruhøffer, H. Hager és tsai., “Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue”, *PloS one*, 9. évf., 5. sz., e98187., 2014.

- [25] C. Deben, K. Zwaenepoel, C. Boeckx, A. Wouters, P. Pauwels, M. Peeters, F. Lardon, M. Baay és V. Deschoolmeester, “Expression analysis on archival material revisited: isolation and quantification of RNA extracted from FFPE samples”, *Diagnostic Molecular Pathology*, 22. évf., 1. sz., 59–64. old., 2013.
- [26] M. Cianfrocca és L. J. Goldstein, “Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer”, *The oncologist*, 9. évf., 6. sz., 606–616. old., 2004.
- [27] E. van Schooneveld, H. Wildiers, I. Vergote, P. B. Vermeulen, L. Y. Dirix és S. J. Van Laere, “Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management”, *Breast cancer research*, 17. évf., 1. sz., 21. old., 2015.
- [28] S. A. Thatcher, “Nucleic Acid Isolation”, *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*, Elsevier, 2018, 35–46. old.
- [29] L. Wunderlich, “Molekuláris biológiai technikák”, *Typotex kiadó, Budapest*, 2014.
- [30] G. Gundling, *Nucleic acid isolation method and kit*, US Patent 6,936,414, 2005. aug.
- [31] J.-P. Gillet, S. Varma és M. M. Gottesman, “The clinical relevance of cancer cell lines”, *Journal of the National Cancer Institute*, 105. évf., 7. sz., 452–458. old., 2013.
- [32] S. Masood, “Prognostic/predictive factors in breast cancer”, *Clinics in laboratory medicine*, 25. évf., 4. sz., 809–825. old., 2005.
- [33] N. Bundred, “Prognostic and predictive factors in breast cancer”, *Cancer treatment reviews*, 27. évf., 3. sz., 137–142. old., 2001.
- [34] Y. Yamashita, S. Nishiumi, S. Kono, S. Takao, T. Azuma és M. Yoshida, “Differences in elongation of very long chain fatty acids and fatty acid metabolism between triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer”, *BMC cancer*, 17. évf., 1. sz., 589. old., 2017.
- [35] T. Sørli, Y. Wang, C. Xiao, H. Johnsen, B. Naume, R. R. Samaha és A.-L. Børresen-Dale, “Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms”, *BMC genomics*, 7. évf., 1. sz., 1–15. old., 2006.
- [36] M. Y. Shkurnikov, A. Poloznikov, S. Nikulin, U. Schumacher, D. Wicklein, C. Stürken, V. Galatenko és B. Y. Alekseev, “Transcriptome Guided Drug Combination Suppresses Proliferation of Breast Cancer Cells”, *Bulletin of experimental biology and medicine*, 166. évf., 5. sz., 656–660. old., 2019.
- [37] M. Busby, M. T. Hallett és I. Plante, “The complex subtype-dependent role of connexin 43 (GJA1) in breast cancer”, *International journal of molecular sciences*, 19. évf., 3. sz., 693. old., 2018.
- [38] M. S. Recouvreux, E. N. Grasso, P. C. Echeverria, L. Rocha-Viegas, L. H. Castilla, C. Schere-Levy, J. M. Tocci, E. C. Kordon és N. Rubinstein, “RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes”, *Oncotarget*, 7. évf., 6. sz., 6552. old., 2016.

- [39] M. Wang, H. Zhang, F. Yang, R. Qiu, X. Zhao, Z. Gong, W. Yu, B. Zhou, B. Shen és W. Zhu, “miR-188-5p suppresses cellular proliferation and migration via IL6ST: a potential noninvasive diagnostic biomarker for breast cancer”, *Journal of Cellular Physiology*, 235. évf., 5. sz., 4890–4901. old., 2020.
- [40] R. Jia, Y. Weng, Z. Li, W. Liang, Y. Ji, Y. Liang és P. Ning, “Bioinformatics Analysis Identifies IL6ST as a Potential Tumor Suppressor Gene for Triple-Negative Breast Cancer”, *Reproductive Sciences*, 28. évf., 8. sz., 2331–2341. old., 2021.
- [41] S. Mamoor, “Gene expression of the Interleukin 6 signal transducer, IL6ST (gp130) associates with survival outcomes in breast cancer.”, 2020.
- [42] B. Fu, W. Meng, X. Zeng, H. Zhao, W. Liu és T. Zhang, “TXNRD1 is an unfavorable prognostic factor for patients with hepatocellular carcinoma”, *Biomed Research International*, 2017. évf., 2017.
- [43] B. Shin, R. Feser, B. Nault, S. Hunter, S. Maiti, K. C. Ugwuagbo és M. Majumder, “miR526b and miR655 Induce Oxidative Stress in Breast Cancer”, *International journal of molecular sciences*, 20. évf., 16. sz., 4039. old., 2019.
- [44] D. Degli Esposti, V. N. Aushev, E. Lee, M.-P. Cros, J. Zhu, Z. Herceg, J. Chen és H. Hernandez-Vargas, “miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival”, *Scientific reports*, 7. évf., 1. sz., 1–10. old., 2017.
- [45] T. Okamoto és S. Okabe, “Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution.”, *International journal of molecular medicine*, 5. évf., 6. sz., 657–666. old., 2000.
- [46] M. H. Veldman-Jones, R. Brant, C. Rooney, C. Geh, H. Emery, C. G. Harbron, M. Wapsett, A. Sharpe, M. Dymond, J. C. Barrett és tsai, “Evaluating robustness and sensitivity of the NanoString technologies nCounter platform to enable multiplexed gene expression analysis of clinical samples”, *Cancer research*, 75. évf., 13. sz., 2587–2593. old., 2015.
- [47] S.-H. Jung és I. Sohn, “Statistical issues in the design and analysis of nCounter projects”, *Cancer informatics*, 13. évf., CIN–S16343., 2014.
- [48] A. Bhattacharya, A. M. Hamilton, H. Furberg, E. Pietzak, M. P. Purdue, M. A. Troester, K. A. Hoadley és M. I. Love, “An approach for normalization and quality control for NanoString RNA expression data”, *Briefings in bioinformatics*, 22. évf., 3. sz., bbaa163., 2021.
- [49] M. Canouil, G. A. Bouland, A. Bonnefond, P. Froguel, L. M. ’t Hart és R. C. Sliker, “NACHO: an R package for quality control of NanoString nCounter data”, *Bioinformatics*, 36. évf., 3. sz., 970–971. old., 2020.
- [50] D. Risso, J. Ngai, T. P. Speed és S. Dudoit, “Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples”, *Nature biotechnology*, 32. évf., 9. sz., 896–902. old., 2014.
- [51] M. I. Love, W. Huber és S. Anders, “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”, *Genome biology*, 15. évf., 12. sz., 1–21. old., 2014.

- [52] L. Rubinstein, R. Shoemaker, K. Paull, R. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks és M. Boyd, “Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines”, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82. évf., 13. sz., 1113–1117. old., 1990.
- [53] W. Voigt, “Sulforhodamine B assay and chemosensitivity”, *Chemosensitivity*, Springer, 2005, 39–48. old.
- [54] E. A. Orellana és A. L. Kasinski, “Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation”, *Bio-protocol*, 6. évf., 21. sz., 2016.
- [55] S. Fleige és M. W. Pfaffl, “RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance”, *Molecular aspects of medicine*, 27. évf., 2-3. sz., 126–139. old., 2006.
- [56] K.-T. Liu, I. Yeh, S.-K. Chou, M.-C. Yen, P.-L. Kuo és tsai, “Regulatory mechanism of fatty acid-CoA metabolic enzymes under endoplasmic reticulum stress in lung cancer”, *Oncology reports*, 40. évf., 5. sz., 2674–2682. old., 2018.
- [57] J.-Y. Hung, S.-R. Chiang, K.-T. Liu, M.-J. Tsai, M.-S. Huang, J.-M. Shieh, M.-C. Yen és Y.-L. Hsu, “Overexpression and proliferation dependence of acyl-CoA thioesterase 11 and 13 in lung adenocarcinoma”, *Oncology letters*, 14. évf., 3. sz., 3647–3656. old., 2017.
- [58] A. Karczewska, S. Nawrocki, D. Brborowicz, V. Filas és A. Mackiewicz, “Expression of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and glycoprotein 130 correlates with good prognoses for patients with breast carcinoma”, *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 88. évf., 9. sz., 2061–2071. old., 2000.