

# Az öregedés és a vastagbélbetegségek kialakulásának molekuláris összefüggései

Doktori tézisek

**Dr. Szalayné Dr. Leiszter Katalin**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Dezsőfi Antal, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szmola Richárd, Ph.D., adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Péter Antal, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szaleczky Erika Ágota, Ph.D., szakorvos

Budapest

2015



## 1. BEVEZETÉS

A gazdaságilag fejlett országokban a daganatos kórképek vezetnek a halálozási statisztikákat, és a fejlődő országokban a második helyen állnak. A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint az utóbbi időszakban évente közel tízezer új vastag- és végbélrákos (colorectal cancer /CRC/) beteget regisztráltak hazánkban. Negyven éves kor alatt a sporadikus CRC incidenciája alacsony, majd az idő előrehaladtával egyre gyakrabban fordul elő. Az öregedés során számos makroszkópos és mikroszkópos változás következik be a vastag- és végbélhamban, ami kapcsolatba hozható bizonyos időskori emésztőrendszeri betegségek kialakulásával. Idős korban a kolorektumot érintő molekuláris változások szoros összefüggésben állhatnak a karcinogenezissel. Ugyanakkor a humán kolorektális hám alapvető sejtkinetikai tulajdonságainak, a proliferatorikus és apoptotikus aktivitásnak az öregedés és a karcinogenezis során bekövetkező változása, valamint ezeket a folyamatokat szabályozó, proliferatorikus és apoptotikus gének kifejeződésének megváltozása kevésbé ismertek.

A szomatostatin (SST) egy szabályozó, alapvetően gátló hatású fehérje, ami legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben, a hasnyálmirigyben valamint a bélrendszerben termelődik. A szomatostatinnak endokrin és autokrin/parakrin hatása is van, valamint sejtfelszíni receptoraihoz (SSTR1-5) kötődve számos jelátviteli út működését befolyásolja. A szomatostatin igen fontos tulajdonsága, hogy gátolja a sejtosztódást és apoptózist indukál a hisztológiailag ép és a daganatos szövetekben egyaránt. A tudományos irodalomban kevés adatot találni arra vonatkozólag, hogy az öregedés során hogyan változik a kolorektális hám lokális szomatostatintermelése, és ez milyen összefüggésbe hozható a karcinogenezis során megváltozó SST-termeléssel. A szomatostatinanalóg octreotid sejtosztódást és pusztulást befolyásoló hatása szintén kevésbé ismert humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonalon.

Az öregedés és a karcinogenezis egy lehetséges molekuláris kapcsolódási pontja a gének promoterrégiójában bekövetkező fokozott metiláció. A promoter-hipermetiláció egy epigenetikai változás, ami a DNS bázissorrend megváltozása nélkül módosítja a gének működését. Igen kevés az irodalmi adat azzal kapcsolatban, hogy az öregedés és a karcinogenezis során hogyan változik a metiláció mértéke a szomatostatint kódoló gén promoterrégiójában, illetve colon adenokarcinóma sejtekben megváltozik-e az SST-expresszió demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidin kezelés hatására.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim célja

- a sejtosztódás és az apoptózis intenzitásának vizsgálata szöveti szinten, az élettani öregedés során a vastag- és végbélhamban, valamint a kolorektális adenóma-karcinóma szekvenciában;
- a proliferációt és az apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálata kolorektális biopsziás mintákon az öregedés és a karcinogenezis során;
- a vastag- és végbélhám szomatostatintermelésének vizsgálata az élettani öregedés, és a vastagbélrák kialakulása során, mRNS- és fehérjeszinten egyaránt;
- a szomatostatinanalog octreotid sejtosztódást és apoptózist befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon;
- valamint a szomatostatint kódoló gén promoterrégiójának metilációs vizsgálata, és a génexpresszió változásának vizsgálata demetiláló kezelést követően, HT-29 sejtvonalon.

### 3. VIZSGÁLATI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Minták

Vizsgálataimat a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Sejtanalitika Laboratóriumában végeztem. Szöveti mintavétel diagnosztikus célú, rutin endoszkópos vizsgálat során történt a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika és az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Endoszkópos Laboratóriumaiban, előzetes felvilágosítás és írásos hozzájárulást követően. Az Affymetrix microarray vizsgálathoz 6 szöveti mintát, 41 normál felnőtt mintát és 34 kolorektális karcinómából (CRC) származó biopsziás mintát használtunk fel. A microarray eredményeinket Taqman RT-PCR módszerrel validáltam 3 mintacsoportban (gyermek, felnőtt, CRC) 6-6 mintán. Az RT-PCR validációt az eredeti mintán, vagyis ahol korábban microarray elemzést is végeztünk, valamint független mintaszetten egyaránt elvégeztem. Az fehérjeszintű vizsgálatokban összesen 28 normál gyermek, 30 normál felnőtt, 10 kolorektális adenóma és 33 CRC biopsziás mintát elemeztem. A metilációs array elemzés során 5 gyermek, 5 felnőtt és 9 CRC mintát vizsgáltunk. Az RNS-izolálás céljából vett mintákat a felhasználásukig RNAlater stabilizáló reagensben tároltam  $-80^{\circ}\text{C}$ -on. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a szöveti diagnosztika céljából vett biopsziás mintákból készült paraffinos metszeteket és TMA-kat (Tissue microarray) használtam fel. A minták betegcsoportonkénti megoszlását a táblázat foglalja össze (nő/férfi), az egyes vizsgálati módszereknek megfelelően.

	<b>Gyermek (Gy)</b>	<b>Felnőtt (N)</b>	<b>Adenóma (Ad)</b>	<b>CRC</b>	<b>Összesen</b>
<i>Affymetrix microarray (N/F)</i>	6 (2/4)	41 (26/15)	-	34 (19/15)	<b>81 (47/34)</b>
<i>Taqman RT-PCR – Eredeti mintaszet (N/F)</i>	6 (2/4)	6 (3/3)	-	6 (4/2)	<b>18 (9/9)</b>
<i>Taqman RT-PCR – Független mintaszet (N/F)</i>	6 (3/3)	6 (3/3)	-	6 (1/5)	<b>18 (7/11)</b>
<i>Ki-67 / TUNEL immunhisztokémia (N/F)</i>	14 (7/7)	10 (4/6)	10 (4/6)	10 (3/7)	<b>44 (18/26)</b>
<i>Szomatosztatin immunhisztokémia (N/F)</i>	14 (7/7)	20 (11/9)	-	23 (13/10)	<b>57 (31/26)</b>
<i>Metilációs array elemzés (N/F)</i>	5 (2/3)	5 (2/3)	-	9 (5/4)	<b>19 (9/10)</b>

### **3.2. Microarray vizsgálat**

Biopsziás mintákból RNS-izolálást végeztünk, majd az RNS mennyiségi és minőségi vizsgálatát követően az izolált RNS-ből biotinnal jelölt cRNS próbákat szintetizáltunk. A fragmentációt követően mintánként 10 µg fragmentált cRNS-t HGU133 Plus2.0 array-re (Affymetrix) hibridizáltuk. Mosást követően a chipet antitest amplifikációs festési módszerrel festettük, a gyártó útmutatásai szerint. A fluoreszcens jeleket GeneChip 3000 szkennelrel (Affymetrix) detektáltuk. Az Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálat nyers eredményeinek előfeldolgozását GCRMA metodikával végeztük. Az eltérő expressziót mutató proliferációt és apoptózist szabályozó géneket SAM elemzéssel azonosítottuk. A szelekcióhoz a FoldChange (LogFC) és módosított p-értékeket használtunk. Valamennyi, eltérő expressziót mutató gén további vizsgálatát ANOVA és Tukey HSD teszttel végeztük. A microarray vizsgálat adatai a GEO adatbankban érhetőek el (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a GSE10714, GSE37364 és GSE37267 hivatkozási számon.

### **3.3. RT-PCR validáció**

A microarray mRNS-expressziós vizsgálatok eredményeinek ismeretében, az egyes csoportok között eltérő expressziót mutató gének közül 10 kiválasztott gén (*CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1*, *CCNE1*, *ACVR1B*, *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9*) kifejeződését vizsgálatuk Taqman RT-PCR módszerrel, validáció céljából. A PCR validáció során mindhárom mintacsoportban (normál gyermek, normál felnőtt és CRC) 12 biopsziás mintát (6 eredeti és 6 független) vizsgáltunk. A statisztikai elemzéshez ANOVA és Tukey HSD tesztet alkalmaztunk a következő kritériumok figyelembe vételével: Fold change  $\leq 0,5$  illetve Fold change  $\geq 2,0$  továbbá p-érték  $< 0,05$ .

### **3.4. Fehérjeszintű vizsgálatok**

Az osztódó sejtek azonosításához Ki-67 immunhisztokémiát alkalmaztam. Az apoptotikus sejtek azonosítására TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) módszert használtam. A Ki-67- és TUNEL-negatív, nyugvó sejtek magjait Hoechst-festéssel tettem láthatóvá.

A szomatosztatint termelő sejtek immunhisztokémiai azonosításához nyúl anti-humán poliklonális antitest használtunk. A jelkonvertáló reakció után a sejtmagokat hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá.

A tárgylemezre rögzített és megfestett biopsziás és TMA mintákat nagy felbontású digitális szkener segítségével archiváltuk. A minták kiértékeléséhez Panoramic Viewer digitális mikroszkópot használtam. Az elemzés során a hámsejteket a programba épített jelző/számoló modul segítségével (Marker Counter) számoltam meg. Az osztódó (Ki-67-pozitív /piros/), apoptotikus (TUNEL-pozitív /zöld/) és nyugvó sejtek (Hoechst- vagy hematoxilin pozitív /kék/), valamint a szomatosztatint termelő sejtek (barna) számának pontos ismeretében meghatároztam a mintákban a proliferáció-apoptózis arányt (PAR /proliferative-apoptotic ratio/), a mitotikus indexet (MI = osztódó sejtek száma/összes hámsejtek száma), az apoptotikus indexet (AI = apoptotikus sejtek száma/összes hámsejtek száma), továbbá az SST-termelő hámsejtek arányát.

A Ki-67, TUNEL és SST immunhisztokémia statisztikai értékeléséhez ANOVA tesztet és Tukey HSD tesztet alkalmaztunk. Mindhárom esetben a szignifikancia határt  $p < 0,05$  értéknél állapítottuk meg.

### **3.5. Metilációs array elemzés**

Rutin kolonoszkópia során vett biopsziás mintákból DNS-t izoláltunk. A metilációs vizsgálatokat Methyl-Profiler DNS-metilációs array PCR módszerrel végeztük el (Qiagen) 96 olyan gén esetében, amelyek a tápcsatornai daganatokban jellegzetes metilációs eltérést mutatnak. ANOVA- és Tukey-tesztet használtunk a metilációs array vizsgálat adatainak kiértékeléséhez.

### **3.6. Sejtkultúra kísérletek**

Caco-2 humán epitheliális adenokarcinóma sejteket FCS és gentamycin tartalmú MEM médiumban tenyésztettünk. A Caco-2 sejteket 24 lyukú tenyésztő lemezre ültettük. A sejtekhez MEM-t és gentamycint adtunk FCS nélkül, valamint octreotidot a következő koncentrációban: 0,1 nmol/l, 1,0 nmol/l, 2,5 nmol/l, 5,0 nmol/l és 10,0 nmol/l. Huszonnégy, 48 illetve 72 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük és a további vizsgálatig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A Sub-G1 és az aktív sejtciklusban lévő sejtek (G1+S+G2+M frakciók) arányának meghatározásához áramlási citometriai vizsgálatot végeztünk. A Caco-2 sejteknek a sejtciklus különböző stádiumaiban (Sub-G1, G1, S, G2 és M) való megoszlását

Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze az octreotiddal kezelt és a kontroll csoport között. Szignifikancia határt a  $p < 0,05$  értéknél állapítottuk meg.

A szomatosztatint kódoló gén kifejeződésének változását HT-29 sejtvonalon vizsgáltuk demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidin (5-Aza-dC) adását követően. HT-29 colon adenokarcinóma sejteket 24 órán keresztül növesztettünk sejtenyésző flakóban, majd demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidinnel kezeltük 72 óráig. A kezelést követően a HT-29 sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, majd elvégeztünk a nukleinsav mennyiségi és minőségi ellenőrzését. Egykörös IVT sokszorozó és jelölő reakciót végeztünk One-Cycle Target Labeling and Control Kit felhasználásával. A fragmentált cRNS-t HGU133 Plus2.0 array-re hibridizáltuk, majd a chipet mosását követően ellenanyag sokszorozó festési eljárással jelöltük. A fluoreszcens jeleket GeneChip 3000 leolvasóval detektáltuk. A microarray vizsgálat adatai a GEO adatbankban elérhetőek a GSE29060 hivatkozási számon. A HT-29 sejtek szomatosztatinnal expresszióját Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze az 5-aza-2'-dezoxicitidinnel kezelt és a kezeletlen kontroll csoport között. A szignifikancia határt  $p < 0,05$  értéknél határoztuk meg.



## 4. EREDMÉNYEK

### **4.1. A proliferatorikus és apoptotikus aktivitás változása a vastag- és végbélhamban, az öregedés és a karcinogenezis során**

A proliferáció-apoptózis arány (PAR) és a mitotikus index (MI) szignifikánsan magasabb gyermek (PAR=3,51±2,49; MI=0,33±0,06) és tumoros mintákban (PAR=9,83±7,72; MI=0,42±0,10), mint a szövettanilag ép felnőtt mintákban (PAR=0,88±0,22; MI=0,15±0,06) ( $p<0,05$ ). Mindkét érték folyamatos emelkedést mutat az adenóma-karcinóma szekvencia során. A legmagasabb PAR és MI értékeket a kolorektális karcinómában találtam. Az apoptotikus index (AI) némileg alacsonyabb a fiatal normál vastagbélhamban (AI=0,13±0,06), mint felnőttekben (AI=0,17±0,05), és szignifikánsan alacsonyabb CRC-ben (AI=0,06±0,03) ( $p<0,05$ ). Az AI folyamatosan csökkent az adenóma-karcinóma szekvencia egyes stádiumaiban. A legalacsonyabb apoptotikus indexet kolorektális karcinómában detektáltam. Statisztikailag szignifikáns eltérést nem találtam a PAR és a MI tekintetében a normál felnőtt vastagbélhám (PAR=0,88±0,22; MI=0,15±0,06) és az adenóma (PAR=1,45±0,89; MI=0,13±0,05) között. Ugyanakkor az AI szignifikánsan alacsonyabb adenómában (AI=0,10±0,04), mint az ép felnőtt hámban (AI= 0,17±0,05) ( $p<0,05$ ).

### **4.2. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének expressziójának vizsgálata kolorektális biopsziás mintákban, az öregedés és a karcinogenezis során**

A microarray tanulmányban vizsgált 117 proliferációt szabályozó gén közül négy gén expressziója tért el kizárólag az élettani öregedés során, vagyis a normál gyermek és felnőtt minták között. A karcinogenezis során 13 gén kifejeződése változott lényegesen. Mindkét folyamatban, vagyis az öregedés és a karcinogenezis során 8 gén (*BRCA1*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CDC20*, *CDK1*, *CDKN2B*, *MKI67* és *TFDP1*) fejeződött ki eltérően, statisztikailag is számottevő módon. A microarray adatok alapján az 534 apoptózist szabályozó gén közül 9 gén expressziója változott a normál hámban az öregedés során és 32 gén kifejeződése változott a karcinogenezis alatt. Tizenegy gén (*ACVR1B*, *BRCA1*, *CHEK2*, *DYRK2*, *IFI6*, *SERPINB9*, *SFRP1*, *SOCS3*, *SST*, *TNFSF10* és *ZAK*) expressziója változott mind az öregedés mind a kolorektális karcinogenezis során.

#### **4.3. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálata és összehasonlítása a gyermek és a daganatos minták között**

Szöveti szinten a gyermek és a tumoros mintákban is fokozott sejtosztódást tapasztaltam a normál felnőtt mintákhoz képest, de gyermekekben a sejtosztódás jól szabályozott, míg CRC-ben kontrollálatlan. Ezért a proliferációt és az apoptózist szabályozó gének mRNS-expresszióját a gyermek és a tumoros minták között is összehasonlítottam. Nyolc sejtosztódást szabályozó gén (*BCL2*, *CDKN2B*, *RAD9A*, *BRCA2*, *CCND1*, *CDK1*, *CDK6* és *RBL1*) és 26 apoptózist reguláló gén (*AIFM2*, *AIFM3*, *BTK*, *CIDEB*, *CIDEC*, *DAPK2*, *MAL*, *NLRP1 (LOC728392)*, *SFRP1*, *SIVA1*, *SPN*, *SST*, *TR53I3*, *TNFRSF25*, *ANXA1*, *CBX4*, *CASP4*, *INHBA*, *MYC*, *PLAGL2*, *PMAIP1*, *POLB*, *PROK2*, *SOCS3*, *TNFRSF10B* és *ZAK*) kifejeződése mutatott eltérést statisztikailag is számottevő mértékben.

#### **4.4. Microarray módszerrel végzett mRNS-expressziós vizsgálat eredményeinek megerősítése valós idejű polimeráz láncreakcióval**

A microarray eredmények alapján az egyes mintacsoportok között eltérő expressziót mutató, proliferációt és apoptózist szabályozó gének (*CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1*, *CCNE1*, *ACVR1B*, *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9*) kifejeződését vizsgáltuk Taqman RT-PCR módszerrel. A PCR validáció a proliferációt szabályozó gének expresszió változásának tendenciáját minden esetben megerősítette, az egészséges gyermek, felnőtt és CRC mintákat vizsgálva. A *CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1* és *CCNE1* expressziója határérték szignifikanciát mutatott a gyermek, felnőtt normál és daganatos minták összehasonlításában a Fold change értékeket tekintve. Tukey poszt-teszt megerősítette a *CDC2/CDK1* expresszió változását ( $p < 0,05$ ) az öregedés és a karcinogenezis során. Az apoptózist szabályozó gének közül a *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9* expresszió változásának tendenciáját a PCR validáció is megerősítette. A statisztikai elemzés alapján a *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3* és *IFI6* expresszió változása volt szignifikáns ( $p < 0,05$ ).

#### **4.5. A kolorektális szomatosztatintermelés vizsgálata az élettani öregedés és a karcinogenezis során, mRNS- és fehérjeszinten**

A szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziós vizsgálatához első lépésben az Affymetrix microarray rendszert alkalmaztunk. Ennek során az SST kifejeződését vizsgáltuk egészséges gyermek, felnőtt és daganatos vastag- és végbél biopsziás mintákban. A microarray tanulmány eredményei szerint az élettani öregedés során az egészséges gyermek és felnőtt csoport között nem változik lényegesen az SST expresszió, ugyanakkor szignifikánsan csökkent a tumoros mintákban mind a fiatal, mind az idősebb normál mintákhoz képest ( $p < 0,05$ ).

A microarray eredményeink validációjához valós idejű polimeráz láncreakciót alkalmaztunk. Az eredeti, a független és az egyesített mintaszettekben végzett vizsgálat egyaránt megerősítette, hogy az öregedés során nem változik lényegesen az SST kifejeződés, ugyanakkor CRC-ben szignifikánsan csökken ( $p < 0,05$ ).

Az immunhisztokémiai vizsgálat során normál gyermek, felnőtt és daganatos mintákban meghatároztam a szomatosztatint termelő és azt nem termelő sejtek arányát. A fehérjeszintű vizsgálat szintén megerősítette a korábbi mRNS-expressziós (microarray és RT-PCR) eredményeinket, vagyis a különböző életkorú egészséges vastagbélhamban nem változik az SST-termelés, míg CRC-ben szignifikánsan csökkent a szomatosztatint termelő sejtek aránya ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6. A szomatosztatinanalóg octreotid sejtszétválást és apoptózist befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon**

A szomatosztatinanalóg octreotid sejtszétválást és apoptózist befolyásoló hatását Caco-2 kolorektális adenokarcinóma sejtvonalon vizsgáltam. Az octreotidot öt különböző koncentrációban (0,1 nmol/l, 1,0 nmol/l, 2,5 nmol/l, 5,0 nmol/l és 10,0 nmol/l) adtuk a sejtekhez. Az apoptotikus (Sub-G1 fázisban lévő) sejteknek és a többi, aktív sejtciklusban lévő (G1+S+G2+M) sejteknek az arányát 24, 48 illetve 72 óra elteltével áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Amennyiben a szomatosztatinanalógot 1,0 nmol/l-nél nagyobb koncentrációban adtuk a sejtekhez, akkor a Sub-G1 fázisban lévő apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan magasabb, míg a G1+S+G2+M fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest. A legmagasabb apoptotikus (Sub-G1) és a legalacsonyabb G1+S+G2+M sejtfrakciót 5,0 nmol/l-es octreotid koncentrációnál mértük. A sejtkultúra kísérlet alapján a szomatosztatinanalóg octreotid

hatékonyan növeli az apoptotikus és csökkenti a többi, aktív sejtciklusban lévő sejtek arányát kolorektális adenokarcinóma sejtvonalon, mégpedig koncentrációfüggő módon.

#### **4.7. A szomatosztatinpromoter-metiláció és reverzibilitásának vizsgálata**

Szövettanilag ép gyermek, felnőtt és CRC mintákban metilációs array elemzés segítségével vizsgáltuk a metiláció mértékét a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójában. Eredményeink alapján a metiláció mértéke folyamatosan növekszik az öregedés és a karcinogenezis során. A legalacsonyabb metilációs arányt a fokozott, és jól szabályozott sejtosztódással jellemezhető gyermek mintákban, a legmagasabb metilációs arányt a daganatos mintákban találtuk. A gyermek mintákhoz képest szignifikánsan magasabb a promotermetiláció a tumoros mintacsoportban.

A szomatosztatint promotermetilációjának reverzibilitását HT-29 colon adenokarcinóma sejtvonalon vizsgáltuk, demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidin adását követően. Mérsékelt mRNS-expressziós növekedést észleltem 5-aza-2'-deoxicitidin hatására, a kezeletlen kontroll csoporthoz képest.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám első részében a kolorektális hám proliferatorikus és apoptotikus aktivitását vizsgáltam az élettani öregedés és a karcinogenezis során. mRNS- és fehérjeszinten tanulmányoztam és hasonlítottam össze a gyermek mintákat egészséges felnőtt és daganatos mintákkal a fent említett sejtkinetikai folyamatokban. Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a gyermek és a daganatos mintákban fokozott a sejtosztódás és csökkent mértékű az apoptózis, továbbá a legnagyobb sejtkinetikai változást a tumoros mintákban találtam. Ugyanakkor alapvető különbség a gyermek és a daganatos vastagbélhamban tapasztalt fokozott sejtgyparodás között, hogy míg az első esetben ez jól szabályozott, kiegyensúlyozott folyamat, ami a fiziológiás növekedéshez lehet szükséges, addig a karcinómában szabályozatlan és kontrollálatlan a sejtosztódás. Eredményeink szerint ennek a megfigyelésnek a hátterében állhat, hogy bizonyos proliferációt és apoptózist szabályozó gének (pl. *CDK1*, *CDK6*, *CCND1*, *CDKN2B*, *SFRP1*, *SOCS3* és *SST*) expressziója szignifikánsan eltér a gyermek és a daganatos mintákban.

A szomatosztatin az egyik legfontosabb természetben is előforduló, antiproliferatív hatású hormon. Vizsgálatainkban a kolorektális hám lokális szomatosztatintermelését tanulmányoztuk mRNS- és fehérjeszinten szövettanilag ép gyermek, felnőtt és daganatos mintákban. Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az élettani öregedés során nem változik lényegesen a szomatosztatintermelés a vastagbélhamban, ugyanakkor jelentősen csökkent kolorektális karcinómában. CRC-ben a lokális szomatosztatintermelés hiánya hozzájárulhat a fokozott és szabályozatlan sejtosztódáshoz. Ezzel a megfigyeléssel összhangban, sejt kultúra kísérletünkben a szomatosztatinanalóg octreotid hatékonyan gátolta a sejtosztódást és fokozta a sejtpusztulást. A daganatos vastagbélhamban a csökkent szomatosztatintermelésre egy lehetséges magyarázat a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójában észlelt reverzibilis hipermetiláció. A szomatosztatinanalógok és demetiláló hatású vegyületek további vizsgálata szükséges a sporadikus vastag- és végbélrák kezelésében betöltött lehetséges szerepükkel kapcsolatban.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke:

**Leiszter K**, Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, Valcz G, Kalmár A, Múzes G, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Az öregedés jelei az emésztőrendszerben. *Magy Belorv Arch*, 63: 19-24.

**Leiszter K**, Galamb O, Sipos F, Tóth K, Valcz G, Patai V. Á, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Az öregedés mikroszkópos és molekuláris jelei a vastagbélben, valamint ezek lehetséges szerepe az időskori vastagbélrák kialakulásában. *Orv Hetil*, 151: 885-892.

Sipos F, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2011) Effect of ageing on colonic mucosal regeneration. *World J Gastroenterol*, 17: 2981-2986.

**IF: 2,471** (2011)

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

**IF: 3,534** (2013)

**Leiszter K**, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai V. Á, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2015) Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*, 10: e0118332.

**IF: 3,534** (2013)

## **6.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke:**

Molnár J, Molnár B, Tóth K, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2008) A szelénhiány és az emésztőszervi daganatos betegségek kapcsolata - Irodalmi áttekintés. Magy Belorv Arch, 61: 13-19.

Igaz P, Szücs N, Retteghy T, **Leiszter K**, Hagymási K, Rác K, Tulassay Z. (2008) Non-Hepatic Coma in a Cirrhotic Patient due to Chronic Subdural Hematoma. Orv Hetil, 2: 451-453.

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, **Leiszter K**, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2009) Szabad DNS-alapú vastagbél-daganat-szűrés perifériás vérből: a metilált szeptin-9 génmarker lehetőségei. Orv Hetil, 150: 969-977.

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Wichmann B, Tóth K, **Leiszter K**, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Müzes G, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2009) A csontvelő eredetű őssejtek megjelenése az ép vastagbélhámokban és a gyulladást követő hámregenerációban. Orv Hetil, 150: 1852-1857.

Sipos F, Müzes G, Valcz G, Galamb O, Tóth K, **Leiszter K**, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2010) Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol, 45: 440-448.

**IF: 1,966** (2010)

Molnár B, Galamb O, Sipos F, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2010) Molecular pathogenesis of Helicobacter pylori infection: The role of bacterial virulence factors. Dig Dis, 28: 604-608.

**IF: 1,0** (2010)

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai V. Á, **Leiszter K**, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*, 16: 541-545.

**IF: 1,483** (2010)

**Leiszter K**. (2011) Beszámoló a XI. Gasztroenterológiai Továbbképző Konferenciáról és az Országos Gasztroenterológiai Kötelező Szintentartó Továbbképző Tanfolyamról. *Magy Belorv Arch*, 64: 118.

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, **Leiszter K**, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The influence of methylated Septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 17: 503-509.

**IF: 1,366** (2011)

Valcz G, Krenács T, Sipos F, **Leiszter K**, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Múzes G, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathol Oncol Res*, 17: 11-16.

**IF: 1,366** (2011)

Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, **Leiszter K**, Múzes G, Zágonyi T, Tulassay Z, Molnár B. (2011) Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from nonIBD colitis by genomewide gene expression profiling. *Dis Markers*, 30: 1-17.

**IF: 1,642** (2011)

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai V. Á, Wichmann B, **Leiszter K**, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2011) Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *J Clin Pathol*, 64: 771-775.

**IF: 2,306** (2011)



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

**IF: 1,555** (2012)

Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, **Leiszter K**, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One*, 7: e48547.

**IF: 3,73** (2012)

Kalmár A, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Tóth K, **Leiszter K**, Tulassay Z, Molnár B. (2013) Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods*, 59: S16-19.

**IF: 3,221** (2013)

Bencze A, Szücs N, Igaz P, **Leiszter K**, Nagy Z, Patócs A, Rác K. (2013) Carcinoid szívbetegség. *Orv Hetil*, 154: 546-550.

Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, **Leiszter K**, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLoS One*, 9:e115415.

**IF: 3,534** (2013)

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám során szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:

- Programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, Prof. Dr. Rácz Károlynak és témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy lehetővé tették és támogatták Ph.D. munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján.

- Dr. Dezsőfi Antal adjunktus úrnak és Dr. Szmola Richárd adjunktus úrnak, valamint Dr. Hagymási Krisztina adjunktus asszonynak és Dr. Reismann Péter tanársegéd úrnak Ph.D. dolgozatom alapos áttekintéséért, szakmai bírálatukért.

- Dr. Krenács Tibornak, az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért.

- Dr. Veres Gábor docens úrnak a gyermek minták gyűjtésében nyújtott segítségéért és szakmai támogatásáért.

- A Sejtanalitikai Laboratórium senior kutatóinak, Dr. Sipos Ferencnek, Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának és Dr. Spisák Sándornak szakmai támogatásukért.

- Dr. Tóth Kingának, Kalmár Alexandrának, Dr. Schöller Andreának, Nagy Zsófiának, Barták Barbarának, Dr. Valcz Gábornak, Dr. Patai V. Árpádnak, Fűri Istvánnak és Berczik Máriának támogatásukért és barátságukért.

- Dr. Wichmann Barnának a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért.

- Kónyáné Farkas Gabriella és Csorba Gézáné Marica szakasszisztenseknek a gyakorlati munkámban nyújtott segítségükért.

- A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájának Endoszkópos Laboratóriumában dolgozó valamennyi orvosnak és asszisztensnek a biopsziás minták gyűjtésében nyújtott segítségükért.

- A Sejtanalitikai Laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak támogatásukért.

- Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéremnek, hogy megteremtették azt az erkölcsi és anyagi alapot, amely nélkül munkámat nem végezhettem volna el.

- Végül, de legkevésbé sem utolsó sorban Férjemnek és Kislányomnak pótolhatatlan szeretetükért és támogatásukért.



