

A vastagbél-daganat kialakulásának in situ és perifériás vér biomarkerei

Doktori tézisek

Dr. Tóth Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Dank Magdolna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika, Ph.D., megbízott osztályvezető főorvos

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

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

Budapest

2015

BEVEZETÉS

A vastag- és végbéldaganatok előfordulása és gyakorisága világszerte növekszik. A colorectális rák napjainkban a harmadik leggyakoribb daganattípus, férfiaknál a prosztatata- és tüdőtumороkat, nőknél az emlő- és tüődaganatokat követve. A vastagbél daganatok szűrésére manapság számos módszer használható, melyek két nagy kategóriába sorolhatók: 1) széklet tesztek vagy nem invazív tesztek (gFOBT - guajak-alapú occult székletvér teszt, FIT vagy iFOBT- immunkémiai székletvér teszt és széklet DNS teszt) és 2) eszközös vizsgálatok vagy invazív módszerek (flexibilis sigmoidoscopia, kettős kontrasztos irrigoscopia, CT colonographia - virtuális colonoscopia vagy colonoscopia). A diagnózis mihamarabbi felállítása azonban sok esetben nehéz a jellegzetes vagy specifikus tünetek (pl.: széklethabitus változás, véres széklet, hasi fájdalom vagy fogyás) hiánya miatt. A vastagbél daganatok szűrésének célja az, hogy a daganatokat korai stádiumban észleljük, esetleg a daganatokat megelőző adenoma stádiumot kimutassuk, így megelőzzük az előrehaladott stádiumok kialakulását.

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányult a perifériás vérben szabadon keringő DNS molekulák kutatására. Először autoimmun, majd daganatos páciensek plazma mintáiban figyeltek meg az egészséges kontroll mintákhoz képest szignifikánsan magasabb keringő DNS szintet.

Vastagbél daganatok kialakulása során számos genetikai és epigenetikai változás felhalmozódása történik, amelyek az ép vastagbélhám (epitélium) adenocarcinomává való átalakulását eredményezik. Az epigenetikai eltérések egyik típusa, a megváltozott DNS metiláció számos gén működésének szabályozásában játszik szerepet, így részt vesz az egészséges fejlődésben, de kulcsfontosságú a tumorképződés során is. Bizonyos gének promóter régiójuk fokozott metilációja (hipermetilációja) útján inaktiválódnak, amelynek következtében fontos sejtfolyamatok módosulnak. Például tumor szuppresszor gének promóter metilációja a génátíródás csökkenését/hiányát okozza, így a folyamat daganat kialakulásához vezet.

A Septin 9 (SEPT9) gén hipermetilációját több tanulmány is leírta vastagbél daganatban szenvedő páciensek vér, illetve biopsziás mintáiban. A SEPT9 a GTP-kötő és filamentumképző fehérjék szupercsaládjába tartozik.

Különböző sejtfolyamatokban vesz részt, mint a sejtosztódás, az aktin dinamika, a sejt motilitás, a sejt proliferáció, a vezikula transzport és az exocitózis. Ennek a komplexitásnak az lehet az oka, hogy az alternatív splicing folyamata során, többféle splice variánsa eltérő fehérjéket kódolhat.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim célja

- a SEPT9 gén metilációs szint eltérések vizsgálata és összehasonlítása perifériás vér és szöveti szinten a vastagbél adenoma-carcinoma szekvencia során;
- a SEPT9 gén hipermetiláció mRNS, illetve fehérje expresszióra gyakorolt hatásának tanulmányozása a colorectális adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladása során;
- a SEPT9 splice variánsok expressziós vizsgálata lézer mikrodisszektált egészséges és vastagbél daganatos mintákban;
- a cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata;
- a metilált SEPT9 szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén és
- a módszer hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel, mint az FOBT vagy az után követésre használt CEA meghatározás.

VIZSGÁLATI MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataimban összesen 141 egészséges, 59 adenomás és 161 vastagbél daganatos páciens plazma és szövetmintáit használtam fel. A kutatásban részt vevő páciensek teljes körű információt kaptak a vizsgálatokról. Azon pácienseknél, akiknél felmerült malabszorpció gyanúja, akut egészségügyi beavatkozást igénylő tevékenység szükséges volt a mintavétel idején vagy a vastagbél tumoron kívül más daganatos megbetegedése volt, nem történt mintavétel. A mintavételt megelőzően és a mintavétel időpontjában a tumoros betegek egyike sem részesült radiológiai vagy kemoterápiás daganat kezelésben. Tanulmányunkban minden páciens átesett rutin kolonoszkópos vizsgálaton. Az endoszkópos vizsgálatot követően, a páciensek, minták osztályozása patológiai szövettani elemzést követően történt.

Duplex RT-PCR

A SEPT9 gén metilációs mintázatának meghatározásához 24 egészséges, 26 enyhén diszplasztikus adenomás (1 cm-nél nagyobb átmérőjű, vagy szövettanilag tubulovillosus, villosus komponens tartalmú) és 34 tumoros (6 I stádiumú, 11 II stádiumú, 11 III stádiumú, 5 IV stádiumú és egy ismeretlen stádiumú) páciens vér-és szövetmintáit használtuk fel. A biopsziás mintákból a homogenizálást követően DNS-t vontunk ki High Pure DNA Mini kit (Qiagen) és a QIAmp DNA Mini kit (Qiagen) segítségével. A plazma minták DNS izolálásához páciensenként 3,5 ml plazmát használtunk az Epi proColon Plasma Quick Kit (Epigenomics) alkalmazásával.

A SEPT9 specificitásának és szenzitivitásának meghatározása céljából 92 egészséges és 92 tumoros (25 I stádiumú, 14 II stádiumú, 35 III stádiumú és 18 IV stádiumú) páciens plazma mintáit elemeztük.

A PCR vizsgálat előtt biszulfid kezelést alkalmaztunk az izolált DNS mintákon, amely során a nem metilált citozin bázisok a biszulfid só hozzáadásának következtében uracillá alakulnak át, és ezt a molekuláris változást lehet kimutatni a duplex PCR eljárás során. Az alkalmazott kvantitatív RT-PCR reakció a metilált CpG helyeket (CpG site) mutatja ki a Septin 9 gén v2 variánsának promóter régióján, másrészt a biszulfid kezelt DNS β -aktin (ACTB) háztartási gén régióján belüli szekvenciáit méri. Az RT-PCR eredmények értékeléséhez detektálási határokat (CT - cycle threshold) vettünk figyelembe. Minden minta esetében 3 PCR ismétlést végeztünk, SEPT9 hipermetilációt akkor igazoltunk egy mintában, ha a 3 PCR reakcióból legalább 2 a detektálási határon belülré esett (SEPT9: <50 CT, ACTB: $\leq 33,7$ CT). Az elemzés során két féle módszert alkalmaztunk. Az 1/3 módszerrel elemezve egy minta akkor tekinthető pozitívnek, ha a 3 PCR ismétlésből legalább 1 CP értékei a detektálási határon belül esnek. A 2/3 módszer szerint viszont SEPT9 pozitív a vizsgált minta, ha a 3-ból legalább 2 PCR replikátum bizonyul pozitívnek.

A szabad DNS (cfDNS) mennyiségi meghatározására a duplex PCR során kimutatható ACTB háztartási gén mennyiségének arányával számoltunk.

Microarray elemzések

Az mRNS expresszió meghatározásához 7 egészséges, 13 adenomás (6 jól differenciált és 7 rosszul differenciált) és 15 CRC-s (5 I stádiumú, 6 II stádiumú és 4 IV stádiumú) beteg biopszia mintáiból izoláltunk teljes RNS-t RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével.

A lézer mikrodisszekált minták 6 vastagbél daganatos (közepesen differenciált, bal oldali, II. stádiumú) beteg sebészi mintáiból származtak, akiknél a tumor mellett polypoid képlet is igazolható volt. A lézer mikrodisszekció során hám és stroma sejteket gyűjtöttünk, majd az ezekből történő RNS kivonáshoz az RNeasy Micro Kit-et (Qiagen) használtuk.

A biopsziás és lézer mikrodisszekált minták esetében is Affymetrix teljes genom microarray elemzést végeztünk. A microarray vizsgálatok statisztikai feldolgozása során elsőként előfeldolgozást alkalmaztunk, amely háttér korrekcióból, normalizációból és összegzésből állt. Ezt követően a különböző csoportok között eltérően kifejeződő géneket SAM (Significance Analysis of Microarray) elemzéssel határoztuk meg. A betegségecsoportok közti eltérések meghatározására ANOVA és post Tukey HSD módszereket alkalmaztunk

Valós-idejű PCR

Hat vastagbél tumoros (közepesen differenciált, bal oldali, II. stádiumú) beteg sebészeti mintájából izolált RNS minta reverz transzkripcióját követően, β -aktin háztartási gén és különböző SEPT9 splice variáns (v1, v2, v4, v4*, v5) primer szekvenciák használatával valós idejű PCR-t végeztünk, amelynek során fluoreszcens SYBR Green festékes kimutatást alkalmaztunk,.

Fehérjeszintű vizsgálat

A SEPT9 metiláció fehérje expresszióra gyakorolt hatásának tanulmányozásához immunhisztokémiai vizsgálatot végeztük 10 egészséges, 14 adenomás (villosus és tubulovillosus) és 13 vastagbél daganatos (II és III stádiumú) biopsziás mintán. A kiértékeléshez a SEPT9 immunhisztokémiai festődés intenzitásának jellemzésére szolgáló pontozási rendszert alkalmaztunk.

Egyéb markerek (gFOBT, CEA) vizsgálata

A retrospektív adatgyűjtés során a székletvér mennyiségének észlelési határa 0,6 mg Hg/gm volt. A CEA teszt mérési tartománya 0,2-1000 ng/mL CEA érték volt. A 4,3 ng/mL feletti értékeket tekintettük kórosnak

EREDMÉNYEK

1. SEPT9 gén DNS metilációs vizsgálata vérplazma és szövettani mintákon

A szöveti mintákban erős szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) figyeltünk meg az egészséges vs. adenoma és az egészséges vs. tumor összehasonlításokban. Az adenoma és a daganatos csoportok SEPT9 metilációs szintje nagy mértékű hasonlóságot mutatott, a fenti két diagnosztikai csoport összevetése során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést ($p = 0,14$). Szignifikánsan magasabb metilált SEPT9 értéket észleltünk a tumoros csoportban, szöveti ($p < 0,001$) és plazmamintákban ($p = 0,01$) egyaránt. Meglepő módon az adenoma mintákban ez a hasonlóság nem igazolódott a két mintavételi csoport között. Az adenoma biopsziákban a tumorhoz hasonlóan emelkedett metilációt kaptunk, míg az adenomás plazmaminták inkább a normálhoz hasonló SEPT9 metilációs mintázatot mutattak. Az egészséges szövet csoportban mindössze egy minta esetében mértünk magas PMR értéket (1/24; 4,2%). Az egészséges plazmaminták közül csupán 2 esetben (2/24; 8,3%) mértünk magasabb PMR %-ot. A fentiek alapján, az adenomás plazmamintákban metilált SEPT9 pozitivitást az esetek 30,8%-ában (8/26), míg az adenomás szövetek 100%-ában (26/26) mértünk.

A daganatos plazmacsoportban az esetek többségénél (30/34; 88,2%) észleltünk SEPT9 metilációt, míg a szöveti tumoros minták 97,1%-ában (33/34) volt kimutatható SEPT9 metiláció. A szövetben mért átlagos PMR érték az adenomás csoportban volt a legmagasabb (29,41%), ehhez hasonló metilációs szintet észleltünk a tumor csoportban is (21,52%), míg az egészséges mintákban mindössze 0,52%-ot. A plazmában ezzel szemben a betegség prognózisával párhuzamosan az átlagos PMR értékek is emelkedtek (0,01%, 0,17% és 5,95%)

2. A SEPT9 gén hipermetilációjának hatása az mRNS expresszióra

A 207425_s_at SEPT9 transzkriptum expressziós szintje alapján az egészséges biopsziás minták elkülöníthetők voltak az adenoma és a tumoros csoporttól. A fenti transzkriptum kifejeződése a késői stádiumú daganatok adenomától és korai stádiumú tumoroktól való megkülönböztetésére is alkalmasnak bizonyult ($p < 0,01$).

A 1559025_at transzkriptum vizsgálata során ezzel szemben az tapasztaltuk, hogy az egészséges minták és az enyhén diszplasztikus adenomák hasonló expressziót mutattak, míg a súlyosan diszplasztikus adenomák mRNS expressziója a tumorokéhoz állt közel.

3. A SEPT9 gén metiláció hatása a fehérje expresszióra

Legerősebb, 100%-os (10/10) SEPT9 fehérje termelődés az ép mintákban észleltünk: a lumenális epitélium felé egyre intenzívebb, diffúz SEPT9 fehérje kifejeződést mutattunk ki. Az adenomás minták döntő részében elsősorban a hámsejtek apikális citoplazmájában tapasztaltunk közepes vagy gyenge immunreakciót, a +2 score értékű immunreakciót mutató sejtek aránya 42,8%-os (6/14) volt. A legtöbb tumoros mintában azonban a SEPT9 festődés elég heterogénnek bizonyult, itt a +2 score értéket a minták 38,4%-ában (5/13) állapítottuk meg.

4. A SEPT9 mRNS expresszió vizsgálata lézer mikrodisszekált mintákon

A stromasejtek vizsgálatakor, az egészséges és adenomás mintákban hasonló 1559025_at SEPT9 transzkriptum expressziót kaptunk, míg a tumoros sejteknél ettől eltérő mRNS szintet mértünk. Az epitélium esetében az adenoma-carcinoma szekvencia előrehaladásának megfelelően csökkent a SEPT9 mRNS expresszió. Szignifikáns különbséget észleltünk a normális vs. adenoma ($p < 0,05$) és a normális vs. tumor ($p < 0,01$) összehasonlításokban.

A hámsejtek vizsgálata során, a SEPT9_v1, _v2, _v4, _v4* és _v5 splice variánsok közül az ép vs. tumor összehasonlításban a legnagyobb (17,4x) különbséget a SEPT9_v2 esetében észleltük.

5. A cirkuláló szabad DNS mennyiség és a SEPT9 gén metilációs szint korrelációjának vizsgálata

A szabad DNS mennyiségi meghatározása során, szignifikáns különbséget ($p < 0,01$) csak az egészséges és daganatos minták összehasonlításakor tapasztaltunk. A mért átlagos szabad DNS mennyiség normális plazmaminták esetében 20,52 ng/ml, az adenomás mintákban 37,64 ng/ml és a tumoros minták esetében 70,32 ng/ml volt.

A SEPT9 metilációs szint és a szabad DNS szint összehasonlításakor, a korai daganatok esetén gyengébb ($R^2 = 0,254$) a késői tumoroknál erősebb ($R^2 = 0,483$) kapcsolatot tapasztaltunk.

6. A mSEPT9 marker szenzitivitásának és specificitásának meghatározása eltérő lokalizációjú (jobb és bal oldali) vastagbél daganatok esetén

Az 1/3 elemzési módszert követve az egészséges minták 15,2%-a (14/92) mutatott mSEPT9 pozitivitást, míg a tumoros minták esetén ez az érték 95,6%-osnak bizonyult (88/92). A lokalizáció szempontjából nem tapasztaltunk különbséget a SEPT9 metilációs szintben: a bal oldali tumorok 96,4%-ánál (54/56), a jobb oldali tumorok 94,4%-ánál (34/36) észleltünk pozitivitást. A tumoros csoportot AJCC szerinti stádiumokra felbontva, a II. stádiumtól kezdve minden minta mSEPT9 pozitívnak bizonyult, míg az I. stádiumban a minták csupán 84%-a (21/25) mutatott mSEPT9 pozitivitást. Így a mSEPT9 marker szenzitivitása 95,6%-os (95%-os konfidencia intervallum 89,2%-98,8%), specificitása 84,8%-os (95%-os konfidencia intervallum 75,8%-91,44%) volt.

A 2/3 elemzési módszert alkalmazva, az egészséges mintákból csupán egy esetben tapasztaltunk mSEPT9 pozitivitást (1%; 1/92). A tumoros minták esetében is kevesebb bizonyult mSEPT9 pozitívnak (79,3%; 73/92). Lokalizáció szerinti összehasonlításban is kisebb eltérést tapasztaltunk. A bal oldali tumoros minták 85,7%-ában (48/56), míg a jobb oldaliak 69,4%-ánál (25/36) észleltünk SEPT9 metilációt. A 2/3 elemzési módszerrel 99%-os specificitást (95%-os konfidencia intervallum 94,1%-100%) és 79,3%-os szenzitivitást (95%-os konfidencia intervallum 69,6%-87,1%) tapasztaltunk. Az alacsony szenzitivitás miatt a tumoros stádiumok összehasonlításánál is alacsonyabb értékeket kaptunk (60%-77,8%).

7. A mSEPT9 marker hatékonyságának összehasonlítása egyéb nem invazív módszerekkel

Az egészséges páciensek 29,4%-ánál (5/17), míg a tumoros betegek 68,2%-ánál (15/22) tapasztaltunk occult vérzést. A tumoros betegek esetében a várt módon több ($p=0,09$) bal oldalinál (83,3%; 10/12) észleltünk gFOBT pozitivitást, mint a jobb oldaliaknál (50%; 5/10). Vizsgálatunkban a gFOBT szenzitivitása vastagbél tumorokra csupán 68,2%-osnak (95%-os konfidencia intervallum 45,1-86,1%), specificitása 70,6%-osnak (95% konfidencia intervallum 44-89,7%) bizonyult.

Az egészséges páciensek 14,8%-ában (4/27), a tumoros csoportban 51,8%-ban (14/27) tapasztaltunk CEA pozitivitást. Ennél a vizsgálatnál sem észleltünk szignifikáns különbséget ($p=0,34$) a jobb (41,7%; 5/12) és bal oldali (60%; 9/15) tumorok között.

Bár a CEA emelkedést szűrésre nem használják, megvizsgáltuk a módszer érzékenységét és fajlagosságát vastagbél tumorokra: a szenzitivitása 51,8%-os (95%-os konfidencia intervallum 31,9-71,3%), specificitása 85,2%-os (95%-os konfidencia intervallum 75,8-91,4%) volt.

KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a metilált SEPT9 gén a vastagbél tumorok specifikus és szenzitív biomarkere szöveti és perifériás vérmintákban egyaránt. A módszer a vastagbél tumorok szövet és plazmamintákból történő kimutatására egyaránt alkalmasnak bizonyult.

A módszer daganat megelőző állapotok szűrésére csak szöveti szinten alkalmazható. A daganatok szűrésére már a korai stádiumokban is használható a megfelelő elemzési módszert alkalmazva. A mSEPT9 marker kimutatása a perifériás vérből is elvégezhető, ezáltal komoly társadalmi hatásai lehetnek a vastagbél tumorok szűrése terén a kedvező compliance miatt. A betegek részvételi aránya ugyanis az eddig használt leghatékonyabb módszer, a vastagbél tükrözés esetében igen alacsony. Fontos azonban megjegyezni, hogy a mSEPT9 marker vizsgálata nem helyettesíti a vastagbél tükrözést, de használatával csökkenteni lehetne a feleslegesen elvégzett, invazív vizsgálatok számát. Napjainkban ugyanis az egyre növekvő vastagbél tumoros esetszám, egyre több vastagbél tükrözést, ezzel együtt egyre több, a tükrözéshez értő szakembert, és műszert igényel. A perifériás vérből történő szűréssel így csak azokat a pácienseket kellene a tükrözésnek alávetni, akiknél a teszt pozitív, ezáltal nem csupán időt, energiát, hanem költségeket is megtakaríthatnánk. A mSEPT9 kimutatási módszert mint alternatív szűrési módszert ajánlhatnánk a pácienseknek, így növelve a szűrésekben résztvevők arányát.

LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- A mSEPT9, mint perifériás vér alapú biomarker, már korábban is ismert volt, de a SEPT9 gén metilációs mintázatát vizsgálataimban hasonlítottam össze először ugyanazon páciensektől vett szöveti és vérmintákban. A normális mintacsoportnál alacsony, míg a tumorosnál magas metilációs szintet mutattam ki. A két különböző eredetű mintatípus között az adenomás csoportban észleltem eltérést, ugyanis a szöveti mintákban magas, míg az adenomás plazmamintákban alacsony SEPT9 metilációt tapasztaltam.
- A mSEPT9 marker nem alkalmazható adenoma szűrőműszerként perifériás vérből, azonban a biopsziás mintákban megbízhatóan jelzi az adenomák jelenlétét.
- Lézer mikrodisszekció segítségével elsőként mutattam ki, hogy a SEPT9 metiláció hám eredetű.
- Immunhisztokémiai vizsgálattal megerősítettem a SEPT9 DNS metilációnak a fehérje expresszióra gyakorolt hatását.
- A SEPT9 gén splice variánsainak (SEPT9_v1, _v2, _v4, _v4* és _v5) vizsgálatával kimutattam, hogy a SEPT9_v2 transzkriptum expressziója tér el leginkább a normális és tumoros minták között.
- A szabad DNS szint és a SEPT9 gén metilációja között korrelációt igazoltam tumoros mintákban, különösen a késői stádiumú vastagbél tumorokban.
- A mSEPT9 marker hatékonyságát összehasonlítva az eddig használt nem invazív módszerekével (mint a gFOBT-vel vagy az utánkövetésre használt CEA szintmeghatározással), a perifériás vérből történő mSEPT9 kimutatás hatékony módszernek bizonyult a vastagbél-tumorok szűrésére.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájában, nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, Leiszter K, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. 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. 2014; 9(12): e115415. **IF: 3,534 (2013)**

Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers. PLoS One. 2012; 7(9): e46000. **IF: 3,73**

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z. The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. Pathol Oncol Res. 2011; 17(3): 503-509. **IF: 1,366**

Molnár B, **Tóth K**, Barták BK, Tulassay Z. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. Expert Rev Mol Diagn. 2015; 15(2):171-184. **IF: 4,27 (2013)**

Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, **Tóth K**, Tulassay Z, Sledziwski AZ, Molnar B. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. BMC Cancer. 2013; 13: 398. **IF: 3,319**

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai ÁV, **Tóth K**, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. PLoS One. 2015; 10(2):e0118332. **IF:3,534**

Bornschein J*, **Tóth K***, Selgrad M, Kuester D, Wex T, Molnár B, Tulassay Z, Malfertheiner P. Dysregulation of CDX1, CDX2 and SOX2 in patients with gastric cancer also affects the non-malignant mucosa. J Clin Pathol. 2013; 66(9): 819-822. * társ első szerzők **IF: 2,551**

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai ÁV, **Tóth K**, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. *PLoS One*. 2013; 8(10): e74140. **IF: 3,534**

Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, Krenács T, **Tóth K**, Leiszter K, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48547. **IF: 3,73**

Patai AV, Molnár B, Kalmár A, Schöller A, **Tóth K**, Tulassay Zs. Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis*. 2012; 30(3): 310-315. **IF: 2,725**

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, **Tóth K**, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z. Increase of α -SMA(+) and CK (+) Cells as an Early Sign of Epithelial-Mesenchymal Transition during Colorectal Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*. 2012; 18(2): 371-376. **IF: 1,555**

Sárvári M, Hrabovszky E, Kalló I, Solymosi N, **Tóth K**, Likó I, Széles J, Mahó S, Molnár B, Liposits Z. Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors α and β in the frontal cortex of middle-aged female rats. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 82. **IF: 3,827**

Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, **Tóth K**, Leiszter K, Muzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B. Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *Dis Markers*. 2011; 30(1):1-17. **IF: 1,642**

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Leiszter K, **Tóth K**, Balogh Z, Csizmadia A, Muzes G, Molnár B, Tulassay Z: The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathol Oncol Res*. 2011; 17(1): 11-16. **IF: 1,366**

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, **Tóth K**, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *J Clin Pathol*. 2011; 64(9): 771-775. **IF: 2,306**

Galamb O, Spisák S, Sipos F, **Tóth K**, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Zs, Molnár B. Reversal of gene expression pattern changes in the colorectal normal-adenoma but less in the normal-carcinoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br J Cancer*. 2010; 102(4): 765-773. **IF: 4,831**

Sárvári M, Kalló I, Hrabovszky E, Solymosi N, **Tóth K**, Likó I, Molnár B, Tihanyi K, Liposits Z. Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged, ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2010; 151(8): 3847-3862. **IF: 4,993**

Sipos F, Múzes G, Valcz G, Galamb O, **Tóth K**, Leiszter K, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2010; 45(4): 440-448. **IF: 1,966**

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, **Tóth K**, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*. 2010; 16(4): 541-545. **IF: 1,483**

Valcz G , Sipos F , Krenács T , Spisák S , **Tóth K** , Molnár B , Tulassay Zs. Az összejték jellemzése, mozgása és terápiás lehetőségei a humán vastagbélben. *Magyar Belorvosi Archívum*, 2009; 62: 272-278.

Galamb O, Sipos F, Solymosi N, Spisák S, Krenács T, **Tóth K**, Tulassay Z, Molnár B. Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(10): 2835-2845. **IF: 4,770**

Tóth K, Galamb O, Solymosi N, Hevér-Pálfy T, Spisák S, Sipos F, Miheller P, Müllner K, Molnár B, Tulassay Zs. Vastagbél-betegségben szenvedők perifériás vérének mRNS expressziós vizsgálata. *Magyar Belorvosi Archívum*. 2007; 60: 531-539.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik segítettek PhD munkám elkészítését:

- programvezetőmnek, **Prof. Dr. Tulassay Zsolt** egyetemi tanárnak, akadémikusnak, és a II. sz. Belgyógyászati Klinika Igazgatójának, **Prof. Dr. Rácz Károly** egyetemi tanárnak, akadémikusnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján;
- témavezetőmnek, **Dr. Molnár Bélának**, hogy irányítása mellett mindig megtaláltam a helyes utat eredményeim eléréséhez;
- **Dr. Müllner Katalin** és **Dr. Nagy Géza** házi opponenseimnek PhD dolgozatom alapos áttekintéséért és hasznos tanácsaikért;
- **Dr. Galamb Orsolyának** és **Dr. Spisák Sándornak**, hogy szakmai tudásuk és támogatásuk segítségével beletekintést nyertem a molekuláris biológia világába és elsajátíthattam a helyes kutatói szemléletmódot;
- **Dr. Sipos Ferencnek**, hogy szakmai tapasztalatával mindig a segítségemre volt;
- **Dr. Solymosi Norbertnek** és **Dr. Wichmann Barnabásnak** a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségükért;
- **Kalmár Alexandrának** és **Dr. Patai Árpádnak** a laboratóriumi munkák kivitelezésében nyújtott segítségükért;
- **Kónyáné Farkas Gabriella** szakasszisztensnek az immunhisztokémiai munkákban nyújtott segítségért;
- **Dr. Leiszter Katalinnak** és **Dr. Valcz Gábornak** a támogatásukért és barátságukért;
- **Berczik Máriának** barátságáért és hogy minden helyzetben a legnagyobb segítséggel fordult felém;
- a **Sejtanalitika Laboratórium** összes munkatársának támogatásukért;
- a **Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópos Részlegének** a mintagyűjtésben nyújtott segítségéért;
- és végül, de nem utolsó sorban **Édesanyámnak**, **Férjemnek** és **Családomnak**, hogy munkám végzése során a nehéz helyzetekben is mellettem álltak és megteremtették azt a biztos hátteret, amely mellett munkámat végezhettem.