Ikerkutatások - a telomeráz rendszer és lehetséges telomer-mitokondrium kölcsönhatások vizsgálatai

Doktori tézisek

Melicher Dóra

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Prof. Dr. Falus András, az MTA rendes tagja, Professor Emeritus

Hivatalos bírálók:
Dr. Aradi János, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Petheő Gábor László, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA rendes tagja, Professor Emerita

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Hrabák András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Prechl József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest, 2018

1. Bevezetés

A (TTAGGG) hexanukleotid ismétlődéseket tartalmazó telomerek védő heterokromatikus struktúrák, melyet speciális proteinkomplexek által kötött DNS tandem ismétlődések alkotnak, és a lineáris kromoszómák végét fedve kulcsfontosságú szerepet töltenek be a genom stabilitásának fenntartásában. A legtöbb szomatikus sejt nem rendelkezik telomeráz aktivitással, sejtosztódások alkalmával progresszív telomer-rövidülést mutat, ami a kromoszóma stabilitás elvesztéséhez és megváltozott epigenetikai mintázat kialakulásához vezethet. A telomer-hosszúságot genetikai és epigenetikai faktorok módosíthatják, diszfunkciói pedig számos humán betegség patobiológiájához járulhatnak hozzá. A telomeráz egy ribonukleoprotein enzimkomplex, mely a telomer szintézis képességégével fenntartja a telomer-hosszúságot. A humán telomeráz komplex két fő komponense a katalitikus reverz transzkriptáz fehérje alegység (hTERT), valamint a telomeráz RNS komponens (hTERC vagy hTR). A telomeráz meghatározó szerepet játszik éppúgy az öregedés folyamatában, mint a rák patológiájában, szerepe van a genom integritásának megőrzésében, a sejtproliferáció kontrolljában és a szöveti homeosztázis szabályozásában.

A telomeráz a legtöbb humán testi sejtben represszált, a limfociták azonban egyedülállók abban az értelemben, hogy képesek megtartani a telomeráz aktiválásának képességét, fenntartva ezzel a telomerek hosszát, így lehetővé téve az intenzív klonális expanziót és proliferációt, amely az effektor-sejtek és hosszú élettartamú memória sejtek generálásához

szükséges. A replikációs kapacitás létfontosságú a limfocita funkció szempontjából, így a telomeráz aktivitást általában a sejtek proliferatív aktivitásának markereként említik.

A mitokondriumok alapvető sejtstruktúrák, meghatározó funkciójuk az ATP generálás, nélkülözhetetlen szerepük van mind a sejtnövekedés, differenciálódás, replikáció és sejthalál folyamataiban. Az öregedési folyamatot a mitokondriális reaktív oxigéngyökök termelésének növekedése, a mtDNS-ben felhalmozódó mutációk, a mitokondriális biogenezis zavara és a mitokondrium általános funkciócsökkenése jellemzi. A mitokondriális DNS kópiaszám, a sejtenkénti cirkuláris mtDNS szám, közvetett módon lehetőséget nyújt a növekvő energiaigény kompenzálását feltételezhetően segíteni tudó mitokondriális biogenezis mérésére. Nemrégiben lényeges kapcsolatokat tártak fel az öregedési folyamatban egyaránt központi szerepet betöltő telomer-rövidülés és a mitokondriális diszfunkció között. A legtöbb esetben sejtvonalakon végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a mitokondriális stressz hozzájárulhat a telomer-rövidüléshez és fordítva. Közös szabályozó folyamatokat és bonyolult telomer-mitokondrium közötti interakciókat feltételeznek, azonban a kapcsolat továbbra sem teljesen ismert.

Az egy- és kétpetéjű ikrek egyedülállóan értékes alanyok a genetikai háttér és korai környezeti hatások befolyását kontrollálni kívánó vizsgálatok során. Mind a páron-belüli, mind az ikerpárok közötti összehasonlítások egyaránt hatékony módszerek, az iker-vizsgálatok eredményei új ismeretekkel segíthetik a genetikai és epigenetikai mechanizmusok feltárását és megértését.

2. Célkitűzések

Mind a telomeráz aktivitás, a hTERT protein szint, a telomer-hosszúság és a mitokondriális DNS kópiaszám a sejtek replikatív kapacitásának fontos tényezői. A telomeráz rendszer és a telomer-mitokondrium feltételezhető összefüggéseiről való ismeretek bővítése céljával, e négy paramétert egyidejűleg kívántuk meghatározni és összehasonlítani, genetikailag kontrollált kísérleti elrendezést alkalmazva, első kutatócsoportként, mely egypetéjű ikreket vizsgál a témában.

Emellett, a genetikai és környezeti tényezők lehetséges hatásgyakorlásáról egypetéjű és kétpetéjű ikrek fenotípusos hasonlóságának összehasonlításával kívántunk bővebb ismereteket nyújtani. Az ikerkutatási elrendezésben rejlő egyedülálló lehetőséget kihasználva, a mtDNS kópiaszám és telomer-hossz tekintetében, a lehetséges genetikai hozzájárulás mértékét az iker-hasonlóságot becslő, intraklassz-korrelációs együtthatók számításával kívántuk közelíteni, MZ és DZ ikrek értékeinek összehasonlításával. Fő céljaink közé tartozott továbbá a mtDNS kópiaszám és a telomer-hossz lehetséges összefüggéseinek ikrekben elsőként történő vizsgálata.

Az alábbiakban tovább részletezzük céljainkat:

T-limfocita alcsoportok eloszlásának vizsgálata különböző korú és nemű monozigóta ikrek perifériás vér-eredetű mononukleáris sejt (PBMC) mintáin, multiparaméteres áramlási citometria alkalmazásával.

- Az iker-hasonlóság összevetése és elemzése a monozigóta ikrek T-sejt alcsoport eloszlására vonatkozólag.

A telomeráz katalitikus reverz transzkriptáz fehérje alegységégének (hTERT) mérése T-limfocita alcsoportokban.
- A hTERT fehérje szintjének elemzése és összehasonlítása a T-limfocitákon belül, a helper-, citotoxikus- és regulátoros T-sejtekben.
- Az iker-hasonlóság összevetése és elemzése az MZ ikrek T-limfocita alcsoportjaiban mért hTERT fehérje szintjére vonatkozólag.

Telomeráz aktivitás detektálása PBMC sejtekben a Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) módszer alkalmazásával.
- Az iker-hasonlóság összevetése és elemzése az MZ ikrek telomeráz aktivitására vonatkozólag.

Abszolút telomer-hosszúság mérés kvantitatív polimeráz láncreakció, standard görbe módszer alkalmazásával.
- Az iker-hasonlóság összevetése és elemzése az MZ és DZ ikrek telomer-hosszúságára vonatkozólag.

Abszolút mitokondriális DNS kópiaszám mérés kvantitatív polimeráz láncreakció, standard görbe módszer alkalmazásával.
- Az iker-hasonlóság összevetése és elemzése az MZ és DZ ikrek mtDNS kópiaszámára vonatkozólag.

Az iker-hasonlóság vizsgálata az MZ ikrek PBMC sejtjeiből egyidőben mért mitokondriális DNS kópiaszám, a

telomer-hossz, a hTERT fehérje szint és a telomeráz aktivitás szintjére vonatkozóan, intraklassz-korrelációs együtthatók kiszámítása és a páron-belüli hasonlósági értékek elemzése az életkor függvényében.

Az MZ és DZ ikrek mtDNS kópiaszám, telomer-hossz és klinikai adatainak bivariáns asszociációs analízise és regressziós modellje.

MZ és DZ ikrek mtDNS kópiaszám és telomer-hossz iker-hasonlóság értékeinek elemzése és összehasonlítása.

3. Módszerek

Vizsgálati alanyok és elrendezés

32 vizsgálati alany, azaz 16 egypetéjű ikerpár került bevonásra a monozigóta iker vizsgálatunkba, amely egyidejű telomeráz aktivitás mérést, a hTERT fehérjeszint és különböző T-limfocita alcsoportok eloszlásának áramlási citometriás detektálását, valamint mtDNS kópiaszám és telomer-hossz méréseket foglalt magában. A 20 és 69 év közötti résztvevők átlagéletkora 46.0 ± 12.88 (év ± SD) volt, 11 nő ikerpár és 5 férfi ikerpár eloszlásban.

142 vizsgálati alany, azaz 96 monozigóta iker (48 teljes pár) és 46 dizigóta iker (23 teljes pár) került bevonásra a mtDNS kópiaszám és telomer-hossz mérés vizsgálatunkba. A 20 és 75 év közötti résztvevők átlagéletkora 50.54 ± 15.43 év volt, köztük 50 ikerpár volt nő és 21 ikerpár férfi. A kutatás alanyai a Magyar Ikerregiszter tagjai közül kerültek bevonásra. A résztvevők - egyszerre egy ikerpár - egy éjszakás poliszomnográfiás vizsgálaton vettek részt, egy folyamatban lévő klinikai kutatás keretein belül a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Tanszék Alváslaboratóriumában, melynek másnap reggelén, egy órával ébredés után, éhgyomori perifériás vérvétel történt.

Minden önkéntes írásos hozzájárulását adta a vizsgálathoz.

Áramlási citometria

A limfocita szubpopulációk azonosítását és azokon belül az intracelluláris hTERT fehérjeszint kimutatását sejtfelszíni antigén egyidejű megfestésével, többszínű áramlási citometria módszerével végeztük. A T-limfociták CD3 expressziójuk alapján kerültek definiálásra. A helper T-sejteket CD3+/CD4+ kettős pozitivitással azonosítottuk, míg a citotoxikus T-sejtek CD3 és CD8 együttes expressziója alapján kerültek meghatározásra. A regulátoros T-sejteket a CD3+/CD4+ sejteken belül a Foxp3 transzkripciós faktor intracelluláris jelenléte jellemezte. A PBMC sejtek viabilitását a festés előtt propidium jodid jelöléssel ellenőriztük.

A hTERT fehérje szintjének kimutatására szolgáló kísérletet az alábbiak szerint végeztük: $5x10^5$ PBMC-szuszpenziót inkubáltunk a sötétben fluorochrome-konjugált antitestekkel az exofaciális festéshez 15 percig, szobahőmérsékleten. A mosási lépés során, a PBS higított sejtszuszpenzió felülúszóját centrifugálással eltávolítottuk, kis mennyiségű folyadék (ca. 100 μL) megtartásával. A sejt-pelletet szobahőmérsékleten 10 percig 4% paraformaldehid oldattal fixáltuk. PBS-ben végzett mosás után a sejteket 0,1% szaponin oldattal permeabilizáltuk, az ezt követő intracelluláris Foxp3 és hTERT fehérje detektálását célzó festés érdekében. Az intracelluláris festés 15 percig tartott. A nem kötött antitesteket 0,1% szaponin oldattal történő mosással eltávolítottuk. Minden antitest gondos titrálásra került megelőző kísérletek során.

A méréseket FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson San Jose, CA, USA) végeztük a festés napján, $1x10^5$

sejt/cső gyűjtésével. A kiértékeléshez és elemzéshez CellQuest-Pro szoftvert (Becton Dickinson San Jose, CA, USA) használtunk. A limfocita szubpopulációkat a limfocita kapun belül, exofaciális fehérje mintázatuk alapján határoztuk meg. Az intracelluláris hTERT fehérje relatív szintjét a fluoreszcencia geometriai átlagcsatorna (eometric mean channel values of fluorescence) értékeinek összehasonlításával elemeztük.

Telomeráz aktivitás mérés TRAP-ELISA módszerrel

A telomeráz aktivitás kimutatásához, az enzim aktivitásának kvantitatív meghatározására alkalmas fotometriás enzim immunvizsgálatot használtuk, a Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) alkalmazásával. A telomeráz aktivitás meghatározásához $2x10^5$ sejtet használtunk fel a vizsgálatok során. A sejteket CHAPS lízis-pufferben lizáltuk, és a TRAP vizsgálatot TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} készlet (Roche Diagnostics GmbH) használatával végeztük, a gyártó utasítását követve, röviden összefoglalva az alábbiak szerint: a PCR alapú kísérletet egy reakcióelegyben (P1-TS biotinilezett telomeráz szubsztrát, P2 nukleotid optimalizált horgony-primer és Taq DNS polimeráz) belső standard (IS) és negatív kontroll (hő inaktivált telomeráz-asszociált RNS) használatával végeztük mintánként. A TS primer telomeráz által közvetített extenzióját lehetővé tevő, 25 °C-on 20 percig tartó inkubálás után, a reakciót a következő lépések szerint végeztük termocycler (GeneAmp PCR System 9700, ABI) használatával: a reakcióelegy 94 °C-on 5 percig tartó inkubálását 30 PCR ciklus követte, 94 °C-on 30 másodperc, majd 50 °C-on 30 mp és

72 °C-on 90 mp-ig. A folyamatot követően a mintákat 10 percig 72 °C-on inkubáltuk. A telomeráz aktivitás meghatározásához a PCR termék denaturálásra került, majd dioxigeninnel jelzett telomerikus ismétlődés-specifikus próbával hibridizáltuk. A PCR-terméket peroxidázzal konjugált, digoxigenin-elleni antitestekkel tettük láthatóvá, 450 nm-en, valamint 690 nm-en mérve ELISA olvasóval (Labsystems Multiscan MS, Thermo).

A relatív telomeráz aktivitást a gyártó utasításait követve számítottuk ki: elsőként a negatív minták abszorbancia-értékét kivontuk a minták abszorbancia értékéből. Amennyiben az abszorbancia különbsége nagyobb volt, mint 0.2 A450nm-A690nm egységek, akkor a mintákat telomeráz pozitívnak tekintettük.

Telomer-hosszúság és mitokondriális DNS kópiaszám mérés

A korábban izolált PBMC sejtekből QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) használatával DNS-t vontunk ki. A minták mindegyikét NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE) számszerűsítettük és minősítettük. Az abszolút telomer-hosszúságot (TL) és az abszolút mitokondriális DNS kópiaszámot (mtDNAcn) kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) mértük. Elsőként az mtDNAcn-t számítottuk ki, a mtDNS mennyisége (Cytochrome b [MT-CYB]) és egy egy-kópiaszámú gén (albumin [ALB]) mennyisége közötti arány alapján. A TL a telomer-ismétlődések és a kvantitatív kontrollként használt, referenciamintához viszonyított, egy-kópiaszámú gén (ALB) mennyiségének arányában került

meghatározásra. Minden qPCR reakciót a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) használatával végeztük, TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA) alkalmazásával. Három qPCR-t végeztünk a telomerek, a mitokondriális genomok (Cytochrome b [MT-CYB]) és az albumin gén [ALB], mint egy-kópiaszámú standard példányszámának meghatározására.

A telomerek primer szekvenciái (O'Callaghan és mtsai 2008), valamint a primerek és TaqMan próba a MT-CYB-hez (Hakonen és mtsai, 2007), korábbi publikációk adatain alapult. Az ALB génhez tartozó primerek és próba, valamint a telomer próbája Primer3 program (Untergasser és mtsai, 2012) alkalmazásával került megtervezésre. A próba fluorophore-t tartalmazott az 5'-végen, 6-carboxyfluoresceint-t és egy quencher-t a 3'-végen, tetramethylrhodamine-t. A primer koncentrációkat 100 nM-ra emeltük, és a következő sokszorozási körülményeket alkalmaztuk: 10 perc 95 °C-on, majd 50 ciklus 95 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 1 percig. Mindegyik mintát három példányban futtattuk 20 ng DNS felhasználásával, és csak akkor fogadtuk el, ha a Ct-értékek standard deviációjára teljesült a következő feltétel: <1Ct (CV> 5%). A telomerek, az MT-CYB és az ALB amplifikációját külön futásokban végeztük, ugyanazon referencia minták felhasználásával, ugyanazon pozíciókban. A standard görbe módszerhez a klónozott amplikonok 6-pontos sorozat-hígítását alkalmaztuk és azonos kalibrátor mintát használtunk minden futásban, a futások közötti eredmények

összehasonlíthatóságának biztosítása céljából. Az adatokat StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA) szoftver segítségével elemeztük. Minden standard görbe megfelelt azoknak a kritériumoknak, hogy a korrelációs koefficiens (R2) nagyobb legyen, mint 0.95, és a PCR hatékonysága 90-100% közötti tartományban legyen.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist linear mixed effects regression model (lineáris vegyes hatás regressziós modell) alkalmazásával végeztük, az Ime4 szoftvercsomag használatával. A statisztikai szignifikancia szintjét $p<0.05$ értékre állítottuk be. A folyamatos változókat átlag ± szórással (SD) fejeztük ki, ha másként nem került meghatározásra. Logaritmikusan transzformált adatokat használtunk az mtDNAcn és a TL esetében, hogy közelítsük a normál eloszlást.

Intraklassz-korrelációs együttható (ICC) számításokat végeztünk az iker-tagok hasonlóságának becslésére. Az ICC-k számítása az alap-, illetve az életkor és nem korrigált vegyes hatás modell reziduális variancia arány felhasználásával történt. A konfidencia intervallumok család alapú 1000 mintás bootstrap alapján kerültek meghatározásra.

A mtDNAcn, a TL és a rendelkezésre álló prediktorok közötti bivariáns összefüggések vizsgálata érdekében teljes-információ maximum valószínűség (full information maximum likelihood) becsült regresszióból származtatott standard együtthatókat alkalmaztunk, melyek életkor és nem korrekciót is megengedtek. A modellek értelmezése hasonló a Pearson

korrelációihoz, de túl azon, figyelembe veszi, hogy ikerpár esetén függetlenség nem határozható meg, valamint számításba veszi az esetlegesen hiányzó prediktor értékeket is. A p értékek klaszter korrigált standard hibák alapján kerültek meghatározásra. Az mtDNAcn és a TL közötti kapcsolat teszteléséhez a fent említett stratégiát alkalmaztuk, és mind a standardizált, mind a nem-standardizált koefficienseket feltüntettük. Emellett a bivariáns analízisben kapott minden szignifikáns prediktort kontrolláló regressziós modellt alkalmaztunk. Az elemzéseket Mplus 8 alkalmazásával végeztük. A statisztikai adatokat a GraphPad PRISM v6.05 (GraphPad SoftwareInc., California, USA) alkalmazásával prezentáltuk.

4. Eredmények

A telomeráz rendszer és a telomer-mitokondrium kérdéskörben vizsgálódva az első olyan kísérletsorozatot végeztük, melyben négy változó egyidejű elemzése történt, iker kutatási módszer alkalmazásával. Iker hasonlósági méréseket végeztünk a telomeráz aktivitás, a hTERT fehérje szint, a telomer-hosszúság és a mitokondriális DNS kópiaszám tekintetében 16 egypetéjű ikerpárban. Kísérleteink során multiparaméteres áramlási citometria, TRAP-ELISA meghatározás, valamint qPCR standard görbe módszereket alkalmaztunk, perifériás vér mononukleáris sejt mintákat használva. Az egyes limfocita alcsoportok iker-hasonlóságának elemzése során elsőként mutattunk ki igen magas intraklassz-korrelációs együttható (intraclass correlation coefficient, ICC) értékeket a T-limfociták hTERT fehérje szintjére vonatkozólag (0.891), éppúgy a helper T-sejtek (0.896), a regulátoros T-sejtek (0.885), valamint citotoxikus T-sejtek (0.798) esetében. A PBMC sejtek kombinált elemzése során magas intraklassz-korreláció értéket mutatott a telomer-hosszúság (0.815), számottevő mértékűt a mitokondriális DNS kópiaszám (0.525) és kifejezetten magasat a hTERT fehérje szintje (0.946), míg a telomeráz aktivitás mértéke rendkívül eltérőnek bizonyult az ikrek között (ICC=0). Emellett a hTERT fehérje relatív szintjét különböző limfocita alcsoportokban elemezve, új eredményként sikerült demonstrálnunk, hogy a regulátoros T-sejtek szignifikánsan magasabb hTERT protein szintet tartalmaztak a

T-limfociták (14.28 ± 1.34), citotoxikus- (15.20 ± 1.74) és helper- T-sejtekhez (14.11 ± 1.34) képest.

A telomer-hosszúság és a mitokondriális DNS kópiaszám kapcsolatának további vizsgálata céljából a mintaszámot lényegesen bővítettük. 142 egészséges alany, köztük 96 egypetéjű és 46 kétpetéjű iker bevonásával szignifikáns pozitív asszociációt igazoltunk ($r=0.28$, $p<0.01$) életkor és nem korrigált analízist végezve. Bivariáns elemzés és további szignifikáns prediktorokkal történő korrigálást követően, a független pozitív asszociáció további megerősítésre került. Emellett a 142 fős mintán az monozigóta és dizigóta ikrek telomer-hossz és mtDNS kópiaszám életkor és nem korrigált hasonlóságát elemeztük. A telomer-hosszúság magas intraklassz-korreláció értéket mutatott mind az MZ (ICC=0.749) és DZ ikrek között (ICC=0.785). A mtDNS kópiaszám tekintetében az egypetéjű ikrek között szintén magas ICC értéket találtuk (ICC=0.758), mely kevéssel meghaladta a DZ ikrek értékét (ICC=0.641).

5. Következtetések

Mind a telomeráz aktivitás, a hTERT protein szint, a telomer-hosszúság és a mitokondriális DNS kópiaszám a sejtek replikatív kapacitásának fontos tényezői.

A telomeráz rendszer és a telomer-mitokondrium feltételezhető összefüggéseiről való ismeretek bővítése céljával, genetikailag kontrollált mintán egyidejűleg határoztuk meg és hasonlítottuk össze a mitokondriális DNS kópiaszám, a telomer-hossz, a telomeráz aktivitás és a telomeráz enzim katalitikus reverz transzkriptáz hTERT alegységének szintjét. 32 monozigóta iker PBMC sejtjeit használva qPCR standard görbe, TRAP-ELISA módszer és multiparaméteres áramlási citometria technikákat alkalmaztunk. Az iker-hasonlóság becsléséhez intraklassz-korrelációs együttható számítást végeztünk.

A hTERT protein szintjét vizsgálva egypetéjű ikrek limfocita alcsoportjaiban, elsőként mutattunk ki nagyon magas ICC értéket T-limfocitákban, a helper-, citotoxikus- és regulátoros T-sejtek körében, míg a T-limfocita szubpopulációk eloszlásának vizsgálatakor a regulátoros- és a citotoxikus T-sejtek mutattak magas ICC értékeket. Négy egyidejűleg mért paraméter eredményeinek értékelés során magas intraklassz-korrelációt kaptunk a telomer-hossz, jelentőset a mitokondriális DNS kópiaszám, és ismét rendkívül magasat a hTERT fehérje szintjét illetőleg, míg ezzel ellentétben, a telomeráz aktivitás nem mutatott hasonlóságot az ikrek között.

Elsőként elemezve a hTERT fehérje relatív szintjét különböző limfocita alcsoportokban, új információval

szolgáltunk arról, hogy a hTERT fehérje a regulátoros T-sejtekben szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen más T-limfociták, citotoxikus- és helper T-sejtekkel összehasonlítva, melynek fényében folytatólagos kutatások több betekintést engedhetnek a regulátoros T-sejtek aktiválásának szabályozásába. A multiparaméteres áramlási citometria egyszerre képes jellemezni az egyes sejtek funkcionális és morfológiai tulajdonságait, amivel híd szerepet tölthet be a proteomika és a citomika között.

A telomer státusz és a mitokondriális funkció lehetséges összefüggéseinek kutatása céljából elsőként vizsgáltuk a mitokondriális DNS kópiaszám és a telomer-hossz kapcsolatát MZ és DZ ikrek mintáin, 142 fő bevonásával. Szignifikáns pozitív asszociációt igazoltunk a két változó között, bivariáns és regressziós modellekkel alátámasztva. MZ és DZ ikrek hasonlósági vizsgálata során intraklassz-korrelációik tekintetében zigozitástól függetlenül hasonlóságot találtunk, mely a közös környezeti tényezők valószínűsíthetően nagyobb szerepét sugallja a nem-közös (egyéni) környezeti és kisebb mértékben az egyéni genetikai hatásokhoz képest.

Kísérleti vizsgálataink eredményeivel újabb kutatásokat kívánunk ösztönözni, jelentősen megnövelt mintaszámú, és bizonyos betegségekre diszkordanciát mutató ikrek bevonásával, valamint longitudinális vizsgálatok tervezésével.

Összegzésként, javasoljuk további kutatások során vizsgálni a telomer-hosszúság és a mtDNS kópiaszám kombinációjának potenciális biomarkerként való alkalmazhatóságának lehetőségét, egészségesekben és specifikus kórképek esetén.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Dóra Melicher, Anett Illés, Éva Pállinger, Árpád Ferenc Kovács, Levente Littvay, Ádám Domonkos Tárnoki, Dávid László Tárnoki, András Bikov, Mária Judit Molnár, Edit Irén Buzás, András Falus
Tight co-twin similarity of monozygotic twins for hTERT protein level of T cell subsets, for telomere length and mitochondrial DNA copy number, but not for telomerase activity.
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, 2017 Dec 30. doi: 10.1007/s00018-017-2738-z. [Epub ahead of print]
Impact Factor 2016: 5.788

Dora Melicher, Edit I. Buzas, Andras Falus
Genetic and epigenetic trends in telomere research: a novel way in immunoepigenetics
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, November 2015, Volume 72, Issue 21, pp 4095-4109
DOI 10.1007/s00018-015-1991-2. Print ISSN: 1420-682X. Online ISSN: 1420-9071.
Impact Factor: 5.694

6.2. Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Tarnoki DL, Tarnoki AD, Littvay L, Lazar Z, Karlinger K, Molnar AA, Melicher D, Garami Z, Berczi V, Horvath I:
Within family transmission of secondhand smoke sensitivity and smoking attitude
ANN AGR ENV MED 21: (4) 771-775, 2014,
Impact Factor: 1.126

Feith Helga Judit dr.; Melicher Dóra; Máthé Gábor; Gradvohl Edina dr.; Füzi Rita dr.; Darvay Sarolta dr.; Hajdú Zsófia; Nagyné Horváth Emília; Soósné Kiss Zsuzsanna dr.; Bihariné Krekó Ilona dr.; Földvári-Nagy Lászlóné Lenti Katalin dr.; Molnár Edit; Szalainé Tóth Tünde dr.; Urbán Veronika dr.; Kassay Adrienn; Falus András dr.
Tapasztalatok és motiváltság: magyar középiskolások véleménye az egészségvédő programokról
ORVOSI HETILAP, 2016, 157(2), 65–69. DOI: 10.1556/650.2015.30338
Impact factor: 0.349

Falus András, Melicher Dóra, Purebl György
Mentális folyamatok epigenetikai szabályozása
ORVOSTOVÁBKKÉPZŐ SZEMLE XXII./1. 2015

Falus András, Melicher Dóra
Az EDUVITAL- koncepció: tudatos epigenetikával együtt az egészségért
MAGYAR TUDOMÁNY 175: (4) 494-497, 2014
Melicher Dóra
Telomérák, a stabilitás őrzői
ÉLET ÉS TUDOMÁNY 70: (36) 1131, 2015

Melicher Dóra, Tárnoki Ádám, Tárnoki Dávid, Métneki Júlia, Littvay Levente
Ikrek és epigenetika
ÉLET ÉS TUDOMÁNY 70: (34) 1070-1071, 2015

Melicher Dóra
Egészségmegőrzés és a Gazdaság
ÉLET ÉS TUDOMÁNY 68: (1) 16-17, 2013